

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SROVNÁNÍ PLODŮ NĚKTERÝCH ODRŮD ZIMOLEZŮ Z HLEDISKA
OBSAHU VYBRANÝCH BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. ONDŘEJ VESELÝ



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SROVNÁNÍ PLODŮ NĚKTERÝCH ODRŮD ZIMOLEZŮ Z HLEDISKA OBSAHU VYBRANÝCH BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

COMPARISON OF THE FRUITS OF SOME HONEYSUCKLE VARIETIES IN TERMS OF CONTENT
SELECTED BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

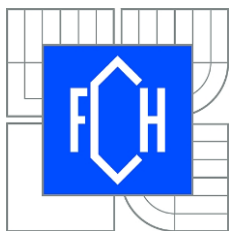
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

BC. ONDŘEJ VESELÝ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

RNDr. MILENA VESPALCOVÁ, Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0917/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Ondřej Veselý	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie	
(2901T010) Vedoucí práce	RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Srovnání plodů některých odrůd zimolezů z hlediska obsahu vybraných biologicky aktivních látek

Zadání diplomové práce:

Literární část:

- 1) Stručný botanický popis zimolezu (*Lonicera kamtschatica*) a účinné látky obsažené v jeho plodech
- 2) Vitamin C, jeho vlastnosti a význam, metody stanovení
- 3) Anthokyaniny, jejich vlastnosti a význam, metody stanovení

Experimentální část:

- 1) Stanovení celkových fenolických látek, celkových anthokyanů a vitaminu C ve šťávách vybraných odrůd zimolezu
- 2) Zpracování a vyhodnocení získaných dat
- 3) Srovnání šťáv studovaných zástupců zimolezu na základě stanovených výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2015

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Ondřej Veselý
Student(ka)

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá analýzou šťáv vybraných odrůd zimolezu kamčatského (*Lonicera caerulea* var *kamtschatica*) a jejich vzájemného porovnání z hlediska obsahu biologicky aktivních látek. Byly analyzovány odrůdy vypěstované v roce 2014. V teoretické části jsou popsány a charakterizovány jednotlivé analyzované parametry biologicky aktivních látek, a to fenolické látky, anthokyany a kyselina askorbová a možnosti jejich stanovení. Dále je v teoretické části popsán zimolez kamčatský, jeho taxonomické a morfologické vlastnosti a jeho nutriční vlastnosti. Experimentální část práce byla zaměřena na popis použitých metod k analýze biologicky aktivních látek a na jejich analýzu samotnou. Polyfenolické látky a anthokyany byly stanovovány spektrofotometricky a vitamín C byl stanovován vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Na základě naměřených výsledků byly jednotlivé odrůdy vzájemně porovnány. Celkově se dá říci, že odrůdou s nejvyšším obsahem všech tří analyzovaných biologicky aktivních látek je odrůda *Valchová*, která měla druhý nejvyšší obsah polyfenolických látek ($546,3 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ plodů), třetí nejvyšší obsah kyseliny askorbové ($35,1 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ plodů) a šestý nejvyšší obsah anthokyanů ($170,8 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ plodů)

ABSTRACT

This thesis is focused to the analysis of selected varieties of honeysuckle kamtschatica (*Lonicera caerulea* var *kamtschatica*) and their comparison in terms of the content of biologically active substances. There were analysed only varieties grown in 2014. Theoretical part elaborates and characterized various parameters of biologically active compounds such as phenolic, anthocyanins and ascorbic acid and possibilities of their determination. Further it briefly surveys Kamchatka honeysuckle, its taxonomic and morphological properties and its nutritional properties. The experimental part of the work was focused on the description of the methods used for the analysis of biologically active substances and their analysis. Polyphenolic compounds and anthocyanin's were determined spectrophotometrically and vitamin C was determined by high-performance liquid chromatography. The results and varieties were compared with each other. Overall, we can say that the variety with the highest content of all three analysed biologically active substances is a variety *Valchová*, which had the second highest content of polyphenolic compounds ($546.3 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ fruits), the third highest content of ascorbic acid ($35.1 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ fruits) and the sixth highest content of anthocyanin ($170.8 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ fruits)

KLÍČOVÁ SLOVA:

Zimolez kamčatský, *Lonicera caerulea* var *kamtschatica*, polyfenolické látky, anthokyany, kyselina askorbová, UV/VIS spektrofotometrie, vysoko-účinná kapalinová chromatografie.

KEY WORDS

Honysuckle (Genuine *Lonicera caerulea*), polyphenolic compounds, anthocyanins, ascorbic acid, UV/VIS spectroscopy, high-performance liquid chromatography.

VESELÝ, O., *Srovnání plodů některých odrůd zimolezů z hlediska obsahu vybraných biologicky aktivních látek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015, 69 s. Vedoucí práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Obsah

1	ÚVOD	9
2	Teoretická část	10
2.1	Botanický popis zimolezu (<i>Lonicera kamtschatica</i>)	10
2.1.1	Pěstování, množení choroby a škůdci	12
2.1.2	Odrůdy zimolezu	12
2.1.3	Popis vybraných odrůd zimolezu	13
2.1.4	Chemické složení	15
2.2	Polyfenolické látky	16
2.2.1	Rozdělení polyfenolických látek	16
2.2.2	Fenolové kyseliny	17
2.2.3	Stilbeny.....	18
2.2.4	Lignany.....	19
2.2.5	Flavonoidy.....	19
2.2.6	Flavonoly.....	20
2.2.7	Flavanoly	22
2.2.8	Flavanony	22
2.2.9	Flavony.....	23
2.2.10	Isoflavony.....	24
2.3	Metody stanovení polyfenolických látek.....	25
2.4	Anthokyany	25
2.4.1	Chemická struktura	25
2.4.2	Výskyt	26
2.4.3	Anthokyany v odrůdách zimolezu.....	27
2.4.4	Vlastnosti anthokyanů a faktory na ně působící.....	27
2.4.5	Anthokyany a jejich funkce v živém organismu	29
2.4.6	Metody stanovení anthokyanů	30

2.5	Vitamín C	32
2.5.1	Význam vitamínu C v lidském organismu	32
2.5.2	Metody stanovení kyseliny askorbové	33
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
3.1	Popis vzorků	35
3.2	Laboratorní vybavení a přístroje.....	35
3.3	Stanovení celkových polyfenolických látek pomocí Folin – Ciocalteuova činidla... 37	
3.4	Stanovení anthokyanů v plodech zimolezu	39
3.5	Stanovení vitamínu C vysoce-účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).....	41
3.6	Statistické zpracování výsledků.....	44
3.6.1	Hodnocení přesnosti měření	44
3.6.2	Hodnocení hrubých chyb	45
4	Výsledky a diskuze	46
4.1	Stanovení celkových polyfenolických látek	46
4.1.1	Kalibrační křivka.....	46
4.1.2	Naměřené a vypočítané hodnoty polyfenolických látek	47
4.2	Stanovení anthokyanů.....	50
4.2.1	Stanovení anthokyanů v plodech zimolezu	50
4.3	Stanovení vitamínu C	53
4.3.1	Vypočtené koncentrace vitamínu C	53
5	Závěr	56
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	58
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	64
	SEZNAM PŘÍLOH	65

1 ÚVOD

Diplomová práce je zaměřena na analýzu šťáv vybraných odrůd plodů zimolezu kamčatského (*Lonicera caerulea* var *kamtschatica*). Zimolez patří mezi bobulovité ovoce, svým vzhledem i chutí připomíná borůvku a podle borůvek je občas zimolez nazýván – kamčatská borůvka. Plody zimolezu mají vysokou nutriční hodnotu a obsahují řadu látek prospěšných pro lidský organismus. Všeobecně mají vysoký obsah barviv – anthokyanů, ale také polyfenolických látek, vitamínu C, vitamínů skupiny B (hlavě B₁, B₂ a B₃), karotenoidů, organických kyselin (jablečná, listová, šťavelová), stopových prvků a dalších látek. Tato rostlina se dále vyznačuje tím, že v našich klimatických podmínkách plodí velice brzy, někdy už v květnu. Díky nehostinnému prostředí, ve kterém se vyvinula, nemá velké nároky na pěstování. Plody zimolezu se konzumují v syrovém stavu, nebo je lze využít k výrobě džemů, marmelád, šťáv, ale také například i k výrobě vína. Domovem zimolezu kamčatského jsou severské země, hlavně Ruská federace, země skandinávského poloostrova, dále pak Čína a Japonsko. V české Republice je pěstován a šlechtěn v několika šlechtitelských ústavech, ale nevyskytuje se ve volné přírodě. Mezi veřejností v České Republice, ale i v Evropě není tento druh bobulovitého ovoce příliš známý.

2 Teoretická část

2.1 Botanický popis zimolezu (*Lonicera kamtschatica*)

Rod zimolez patří do čeledi *Caprifoliaceae* (zimolezovité), přírodně se vyskytuje především v mírném pásu severní polokoule (Euroasie, a Severní amerika). Několik druhů se vyskytuje i v severní Africe. V České republice je pěstován v několika výzkumných ústavech a šlechtitelských centrech, ale v přírodě se volně nevyskytuje. Je známo téměř 180 různých druhů zimolezu, některé se pěstují jako okrasné keře, jiné druhy se uplatňují v ovocnářství. Kompletní taxonomické zařazení znázorňuje tabulka 1 [1, 2].

Tabulka 1: Taxonomické zařazení zimolezu

Soustava	<i>Vitae</i>	živé organismy
Doména	<i>Eukaryota</i>	
Nadříše	<i>Bikonta</i>	
Říše	<i>Plantae</i>	rostliny
Podříše	<i>Tracheobionta</i>	cévnaté
Nadoddělení	<i>Spermatophyta</i>	semenné
Oddělení	<i>Magnoliophyta</i>	krytosemenné
Třída	<i>Rosopsida</i>	vyšší dvouděložné
Podtřída	<i>Asteridae</i>	asteridy
Řád	<i>Dipsacales</i>	štetkováné
Čeleď	<i>Caprifoliaceae</i>	zimolezovité

Plody jedlých zimolezů obsahují řadu nutričně významných a cenných látek, jako například vitamín C, karotenoidy, polyfenoly, vitamíny skupiny B, pektin, třísloviny a anthokyany. Množství antokyanů má vliv na barvu plodu. Plody jsou šťavnatě červené, oranžové, žluté, černé nebo modročerné bobule vyskytující se v párech nebo jednotlivě [3].

Představitelé zimolezů jsou vzpřímené, někdy poléhavé, popínavé nebo plazivé keře. Kořenový systém zimolezu dosahuje až do hloubky 80 cm a větví se do šířky 2 až 3 metrů. Keře zimolezu dosahují výšky 1,6 – 2,5 metru, listy jsou 4 – 10 cm dlouhé 1,3 – 4,2 cm široké oválného, kopinatého či vejčitého tvaru. Listy jsou v závislosti na odrůdě modrošedé, tmavozelené či žlutozelené zbarvené [1, 4, 5].



Obrázek 1: Květy *Lonicera periclymenum* [6]

Květy zimolezu jsou bílé, světle žluté či červené a dosahují velikosti 2 cm. Květy tvoří dvoukvětá květenství a jsou oboupohlavní. Koruna květů je v závislosti na druhu trubkovitá, trychtýřovitá nebo zvonkovitá. Zimolez kvete od února do dubna v závislosti na venkovních teplotách 7 -10 dnů. Květy zimolezu jsou odolné vůči působení nízkých teplot, otevřený květ snáší -8°C a poupata dokonce -10°C [1-4].



Obrázek 2: Zimolez kamčatský odrůda Altaj [7]

2.1.1 Pěstování, množení choroby a škůdci

Jedlé druhy zimolezu vynikají vysokou odolností vůči mrazivým teplotám, odolností vůči chorobám či napadení škůdci. Jediným ze škůdců, který může parazitovat na zimolezu, je houba padlí. Na napadených bobulích a listech se projevuje práškovými skvrnami. Výjimečně se objevují i další škůdci jako například mšice zimolezová či puklice švestková. K napadení škůdci dochází většinou až v červenci, a protože ke sklizni dochází již koncem května, tak napadení škůdci nepředstavuje výraznější problém [8,9,10, 11].

Zimolez má nižší nároky na půdní zásobu živin a pH (snese kyselé, neutrální i zásadité půdy), avšak vyžadují relativně vlhké prostředí. Pokud je zimolez pěstován na rovinatých plochách, které jsou v otevřeném a dobře osvětleném prostředí, tak keře plodí nejvíce. Naopak nežádoucí je pěstování v suchých či přemokřených půdách. Suché a teplé počasí při zrání plodu zvyšuje obsah cukru, tříslovin a barviv, zatímco chladné a deštivé počasí zvyšuje obsah vitamínu C [2, 3, 12].

Zimolez se množí vegetativně nebo generativně (semeny), které se zasévají buď na podzim, nebo na jaře. Výhodnější je zimolez sázet na podzim, protože odpadá nutnost stratifikace (dozrání) semen, která by se musela provádět před jarní výsadbou. Častějším způsobem rozmnožování semen je řízkování (vegetativní rozmnožování). Řízkování se provádí na přelomu července a srpna, a to z rostlin, které ještě neprošly generativní fází. Délka řízků by měla být 100 - 150 mm [9, 14, 15].

2.1.2 Odrůdy zimolezu

V české republice jsou známy a pěstovány tyto druhy zimolezů [3]:

Altaj	Gerda	Modrý triumf	Sineglazka
Afrodita	Gordost Bakčara	Morena	Sinyaya ptica
Amfora	Goluboje vreteno	Narymskaja	Solowyška
Amur	Gželka	Nymfa	Tomička
Bakcarskaja	Kamčadalka	Ognennyj Opal	Vasilijevskaja
Berel	Kola 44	Pamjati Gidzjuka	Vasjuganská
Čeljabinka	Lazurnaja	Remont	Viola
Čulymskaja	Leningradsky velikan	Roksana	Volchova
Dlinnoplodnaya	Mailon	Sibirjačka	Zoluška

Fialka	Maistar	Silginka	
--------	---------	----------	--

Zimolezy lze dělit podle zrání plodu na [3]:

- rané Goluboje vreteno, Tomička, Morena
- středně rané Vasjuganská, Gerda, Zoluška, Sinaja ptica
- středně zrající Amfora, Bakcarskaja, Viola, Nymfa
- středně pozdní Kamčadalka, Roksana, Fialka

Dalším kritériem pro rozdělení a určení kvality odrůdy mohou být [11]:

- *porušení plodu po utržení* – sleduje se vlhkost plodu po utržení
- *integrita* – po provedení mírné dezintegrace se sleduje míra poškození, která se následně hodnotí
- *přítomnost stopky po utržení plodu* – po utržení by stopky neměla být na plodu, protože její přítomnost je v dalším procesu zpracování nežádoucí.

2.1.3 Popis vybraných odrůd zimolezu

Vybrané odrůdy byly vyšlechtěny v Rusku a Japonsku z volně rostoucích divokých druhů, a to konkrétně z botanické variety *Lonicera caerulea* [16].

Altaj - Tato odrůda byla vyšlechtěna na Slovensku křížením druhů *Lonicera kamtschatica* x *Lonicera turczaninowii* ve šlechtitelském ústavu Bojnice v roce 2001. Mrazuvzdorný keř vypínající se do výšky 2 m tvořící kompaktní až mírně rozložené tvary s velkými plody, které jsou na konci zašpičatělé. Bobule mají šťavnatou dužninu sladkokyselé chuti s výrazným borůvkovým arómatem. Jedná se o cizosprašnou odrůdu, která vyžaduje k dokonalému opylení pyl cizí odrůdy. Proto se v ČR společně s odrůdou Amur často prodávají jako vzájemní opylovači. Tato nenáročná odrůda poskytuje vysokou sklizeň a má velmi dobré organoleptické vlastnosti [2, 4, 13].

Amfora - Ruská odrůda vznikla v roce 1998 volným opylením odrůdy „Roksana“. Keř je středního vzrůstu 1,5 m, má okrouhlý, kompaktní tvar. Hmotnost džbánkovitého plodu je 0,89–1,2 g. Barva hladké slupky je fialkově modrá. Dužnina je příjemně sladkokyselá [13].



Obrázek 3: Odrůda "Amfora"

Amur - Odrůda vznikla ve slovenském šlechtitelském ústavu Bojnice z potomstva volného opylení ruské odrůdy Gerda. Keře jsou přibližně 1,5 m vysoké středně husté, kompaktního tvaru. Plody s průměrnou hmotností 0,67–0,8 g mají oválný až hruškovitý tvar a hladkou tmavě modrou slupku. Dužnina je šťavnatá, sladká s mírným borůvkovým aroma. Odrůda je odolná vůči mrazům, chorobám a škůdcům, avšak méně úrodná [2, 13].



Obrázek 4: Odrůda "Amur"

Fialka - Odrůda pochází z ruské výzkumné stanice VIR jako semenáč odrůdy „Roksana“. Keř je hustý, okrouhlého tvaru a středního vzrůstu. Plody o hmotnosti 0,83 g mají džbánkovitý tvar a fialově modrou barvu. Dužnina je sladkokyselá. Odrůda vyniká vysokou mrazuvzdorností [3, 13].

Leningradský velikán - Ruská odrůda vyšlechtěná na VIR ze semen třetí generace zimolezů z okolí Petropavlovsk na poloostrově Kamčatka. Keř je středně vysoký. Plody mají cylindrický zašpičatělý tvar a hmotnost přibližně 1 g. Povrch pevné slupky je mírně hrbolatý s výrazným voskovým povlakem. Dužnina má velmi příjemnou sladkokyselou chuť a výrazné aroma [13].



Obrázek 5: Odrůda "Leningradský velikán"

Goluboje vereteno - Odrůda s raným termínem dozrávání, keř hustý, kompaktní, vyšší nad 1 m. Bobule velké, vřetenovité. Výnos z šestiletého keře dosahuje 2 kg.

Zoluška - Odrůda raného termínu zrání, keř velmi hustý, s kompaktní korunou. Výška u šestiletého keře je 0,6-0,7 m. Bobule velké, s dobrými chuťovými vlastnostmi a slabým aromatem, připomínající borůvky. Výnos u šestiletého keře dosahuje 1,2 kg.

Morena - Odrůda s raným termínem dozrávání, keř silně vzrůstný. Bobule velké, prodlouženě baňkovité, namodrale sivé, kyselosladké s ušlechtilou dužninou.

Sinaja ptica - Odrůda charakteristická bobulemi raně zrajícími, s prodlouženě oválným tvarem. Výnos u šestiletého keře 1,9 kg.keř-1 [17].

2.1.4 Chemické složení

Plody různých druhů zimolezu obsahují v závislosti na pěstelských podmínkách 10–14,6 % sušiny, z toho 14,8 % připadá na rozpustnou vlákninu. Hlavními složkami bobulí jsou:

- sacharidy 7,2 %, z nichž největší zastoupení má glukóza (3,2%) a fruktóza (2,9%)
- 1,1–1,6 % pektinu,
- 1,5 % lipidů – uhlovodíky, steroly, triacylglyceroly, fosfatidin a mastné kyseliny (palmitová, olejová, stearová, linolová)
- 1,6 % proteiny (nejvíce kyselina glutamová a arginin a ve větším množství kyselina asparagová, leucin, fenylalanin a glycin),
- organické kyseliny – 12,2% sušiny, Nejvíce zastoupenými kyselinami jsou jablečná, citrónová, malonová a chininová
- polyfenoly (400–1500 mg.100 g⁻¹)
- anthokyany (400 - 1500 mg.100 g⁻¹)

- Z minoritních složek je zastoupen rutin (100–720 mg.100 g⁻¹), kyselina askorbová (20–50 mg.100 g⁻¹), tokoferoly, vitamíny A, B, β -karoten, triterpenické kyseliny, proanthokyany (700 mg.100 g⁻¹), fenolové kyseliny (160 mg.100 g⁻¹), katechiny (650 mg.100 g⁻¹), kvercetin a isokvercetin (30 mg.100 g⁻¹), minerální látky hořčík, fosfor, vápník a draslík. Celkový obsah biologicky aktivních látek, flavonolů a flavonů je 70–140 mg.100 g⁻¹. Zjištěná energetická hodnota plodů *L. caerulea* byla 1380 kJ.kg⁻¹ [1, 3, 7].

2.2 Polyfenolické látky

Polyfenolické sloučeniny jsou charakterizovány přítomností dvou a více hydroxylových skupin navázaných na aromatickém jádře. Polyfenoly jsou produkovány rostlinami, kde plní nejrůznější funkce, proto jsou řazeny k sekundárním metabolitům rostlin. Slouží rostlinám jako obrana před UV zářením, patogeny, oxidačním stresem, býložravci či slouží jako signální molekuly. Polyfenolické látky se vyskytují zejména v ovoci, zelenině, červeném víně, rybízu a čaji. Živočichové nejsou producenty polyfenolických látek, do jejich těla se dostávají sekundárně v potravě [18-19].

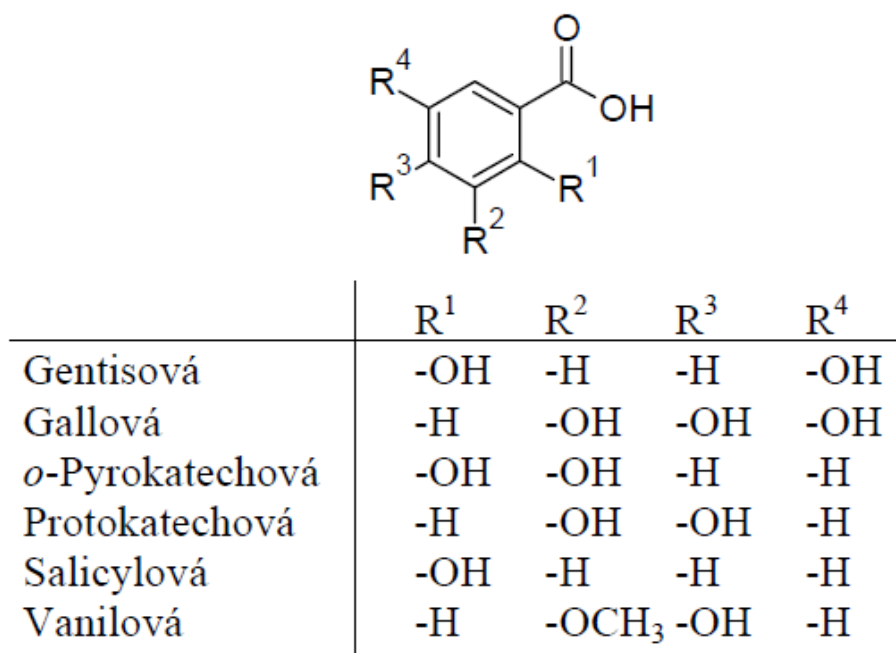
V lidském těle slouží polyfenolické látky jako významné antioxidanty, napomáhají prevenci nádorových onemocnění, jako jsou rakovina prostaty, plic, tlustého střeva či konečníku, dále pozitivně ovlivňují hladinu cholesterolu a slouží jako prevence srdečně cévních onemocnění. Z potravinářského hlediska je nejvýznamnější jejich schopnost ovlivňovat organoleptické vlastnosti potravin, proto se využívají jako potravinářská barviva, chuťové a vonné látky [20-22].

2.2.1 Rozdělení polyfenolických látek

V současné době je známo přes 8000 druhů polyfenolických látek, které lze na základě rozličné chemické povahy rozdělit do několika skupin. Nejjednodušší rozdělení polyfenolických látek je na flavonoidy (anthokyany, flavanoly, flavanoly, dihydroflavanoly) a nonflavonoidy (kyseliny hydroxybenzoové, kyseliny hydroxyskořicové, stilbeny a třekavé fenoly) [19, 23].

2.2.2 Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny patří do skupiny polyfenolických látek, jejichž struktura je odvozena od kyseliny benzoové a jejích derivátů (kyselina protokatechová, salicylová, gallová, vanilová, hydroxybenzoová) a kyseliny skořicové a jejích derivátů (kyselina kumarová, ferulová, sinapová a kávová). Fenolické kyseliny tvoří až jednu třetinu všech polyfenolických látek přijímaných v potravě [1, 19, 24].



Obrázek 6: Deriváty kyseliny benzoové [1]

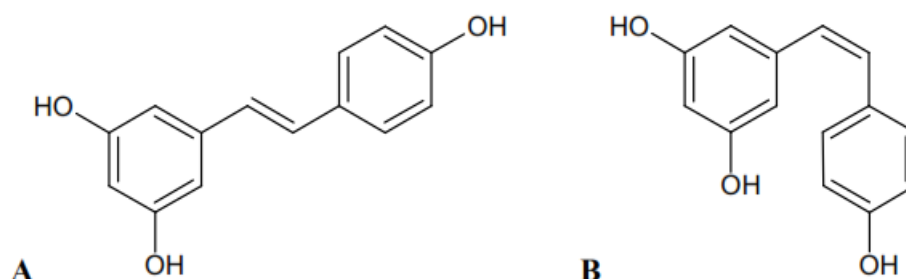
Významnými polyfenoly jsou deriváty kyseliny gallové jinak označované jako tanniny (třísloviny). Tyto látky vznikají esterifikací kyseliny gallové na jednoduchý sacharid. Z chemického hlediska se třísloviny dělí na hydrolyzované (estery kyseliny gallové polygalloylestery) a kondenzované (polymery některých flavonoidních látek se strukturou 3-hydroxyflavanu). Hydrolyzované taniny se dělí na gallotaniny (pokud při jejich hydrolýze vzniká jen kyselina gallová) a ellagotaniny (pokud vzniká kyselina ellagová a příp. i gallová). Kondenzované třísloviny označované také jako proanthokyanidiny vznikají kondenzací monomerních flavanolů [25, 26].

Volně v rostlinách se deriváty kyseliny benzoové prakticky nevyskytují, jsou vázané na sacharidy nebo organické kyseliny. Jejich biologické účinky spočívají v antioxidačním a anti-karcinogenním působení a také snižování obsahu lipidů v krvi (snížení LDL cholesterolu). Deriváty kyseliny skořicové se volně v rostlinách nachází pouze zřídka, nachází se vázané na sacharid nebo kyselinu (např. kyselinu tartarovou, kyselinu šikimátovou, kyselinu chinonovou). Deriváty kyseliny skořicové mají anti-karcinogenní účinek, jsou odolné vůči trypsinovým enzymům, snižují srážlivost krve, a chrání před autoimunitními chorobami [27, 28].

2.2.3 Stilbeny

Stilbeny jsou skupinou látek, která je produktem fenyylpropanoidacetátové dráhy. Svou strukturou jsou velmi podobné flavonolům. Tyto sloučeniny nejsou v rostlinných materiálech příliš rozšířené, proto je lidská potrava na jejich obsah velmi chudá. Vyskytují se ve dvou formách, a to buď volné, nebo vázané jako glykosidy. Stilbeny jsou známé svými antioxidačními a anti-karcinogenními účinky. V posledních letech rapidně vzrostl zájem o tuto skupinu především díky jejímu nejvýznamnějšímu zástupci tj. resveratrolu.

Resveratrol je přirozeně se vyskytující fytoalexin, mající 2 geometrické izomery *cis* a *trans*. V rostlinách se vyskytují obě formy resveratrolu, avšak *trans* izomer se vyskytuje hojněji nežli *cis* izomer. Nejvyšší obsah resveratrolu byl zjištěn v červené vinné révě (2 – 6 mg·l⁻¹), v bílé vinné révě je jeho obsah nižší (0,2 – 0,8 mg·l⁻¹). Dále se vyskytuje v různých druzích zeleniny a ořechů. Dalším představitelem může být jeho glukosid picerol [23, 30].

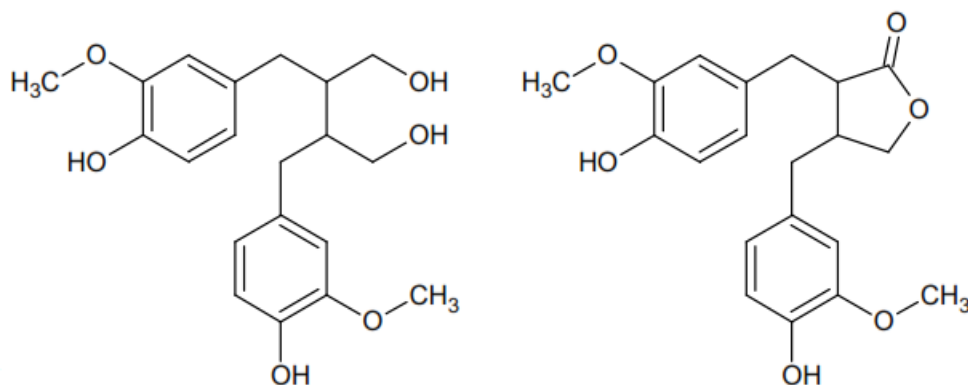


Obrázek 7: Strukturní vzorec resveratrolu. A = *trans*, B = *cis* forma [21]

Přestože se resveratrol vyskytuje v mnoha rostlinných druzích, není jeho obsah pro lidský organismus příliš využitelný. Resveratrol je látkou nepolárního charakteru, která se nerozpouští ve vodě, proto je alkohol ve víně jeho optimálním nosičem. [31, 32].

2.2.4 Lignany

Lignany jsou glykosidy, jejichž aglykon je tvořen koniferylalkoholem, produkty jeho kondenzace, či jinými fenylpropanoly. Nacházejí se v různých rostlinných materiálech, ve dřevě, pryskyřicích, obilovinách, brusinkách, jahodách, kávových bobech, čajových listech, rajčatech a ořeších apod. Lignany mají antioxidační účinky a zároveň slouží jako prevence proti vzniku nádorových onemocnění, především prsu a prostaty, a osteoporóze. Nejvýznamnějšími zástupci lignanů jsou sekoisolariciresinol a matairesinol [17, 19].



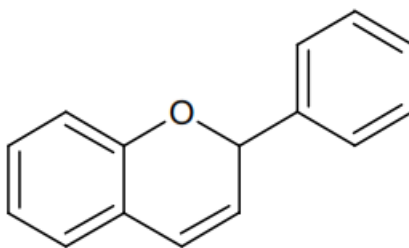
Obrázek 8: sekoisolariciresinol matairesinol [21]

2.2.5 Flavonoidy

Flavonoidy jsou nejfrekvencovanější skupinou sekundárních metabolitů vyšších rostlin. Existuje přes 5000 látek řadících se mezi flavonoidy. Jsou obsaženy v listech, květech a plodech nejrůznějších druhů rostlin. V rostlinách se flavonoidy vyskytují jak ve volné formě, tak ve formě vázané. Majoritní význam ovšem mají vázané flavonoidy ve formě glykosidů.

Z nutričního hlediska jsou flavonoidní látky prospěšné pro lidské zdraví. V lidském těle fungují jako účinné antioxidanty, mají schopnost snižovat riziko vzniku kardiovaskulárních chorob a kornatění tepen. Kromě antioxidačního účinku dosahují flavonoidy i účinku

opačného. Jako prooxidanty působí v molekule flavonoidů především vázané ionty kovů, jako jsou ionty želena, mědi, niklu a molybdenu [17].



Obrázek 9: Struktura flavanu [17]

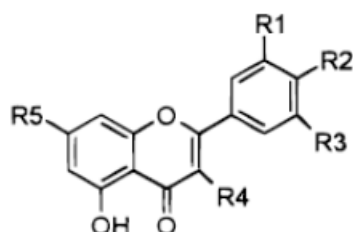
Flavonoidy jsou polyfenolické látky odvozené od flavanu, jehož hlavní skupinu tvoří 2-fenyl-1,4-benzopyron. Základem je tedy flavanové jádro obsahující 15 atomů uhlíku, sestávající ze dvou benzenových jader spojených řetězcem tří uhlíkových atomů tvořících uprostřed pyranový cyklus. Součástí jejich struktury je hydroxylová, methoxylová nebo glykosylová funkční skupina. Množství a pořadí navázaných hydroxylových skupin, stupeň jejich alkylace a glykosidace ovlivňuje vlastnosti flavonoidů [13, 17].

Flavonoidy jsou rozděleny do několika skupin na flavanoly, flavanony, flavony, flavonoly, proantokyanidiny, antokyanidiny a izoflavony, které se od sebe liší nejen strukturou a výskytem, ale také svou funkcí [13].

2.2.6 Flavonoly

Flavonoly jsou žlutá barviva patřící do skupin polyfenolických látek, které se vyskytují převážně ve formě glykosilů. Jsou obsaženy převážně ve vnějších částech rostlin, hlavně ve slupce a listech. Jejich množství v plodech je přímo úměrný množství dopadajícího záření. V čerstvém ovoci a zelenině se nachází přibližně v koncentracích 15 – 30 mg·kg⁻¹. Nejvýznamnějšími flavonoidy jsou kvercetin, kemferol a myricetin.

Červené odrůdy ovoce se vyznačují vyšším zastoupením flavonoidů nežli bílé odrůdy. Bílé odrůdy navíc oproti červeným odrůdám neobsahují myricetin [21, 33].

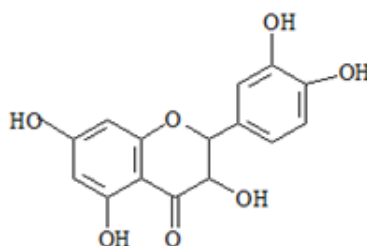


Sloučenina	R1	R2	R3	R4	R5
astragalin	H	OH	H	OGlc	OH
hyperosid	OH	OH	H	OGal	OH
isokvercitrin	OH	OH	H	OGlc	OH
isorhamnetin	OCH ₃	OH	H	OH	OH
kemferid	H	OCH ₃	H	OH	OH
kemferol	H	OH	H	OH	OH
kvercetin	OH	OH	H	OH	OH
kvercitrin	OH	OH	H	ORha	OH
myricetin	OH	OH	OH	OH	OH
rhamnetin	OH	OH	H	OH	OCH ₃
rutin	OH	OH	H	ORut	OH

Obrázek 10: Chemická struktura flavonolů [34]

2.2.6.1 Kvercetin

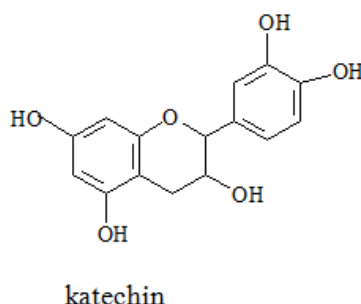
Na kvecertin byla v minulosti zaměřena pozornost hlavně v souvislosti s léčbou nádorových onemocnění. Byl obsažen v rostlinách, které se k léčbě rakoviny používaly. Kvecertin má dále protizánětlivé účinky, působí proti srážlivosti krve a antiateroskleroticky. V přirozené formě je kvecertin neaktivní, k jeho aktivaci dochází až působením střevní mikroflóry. Kvercetin se nachází v ovoci a zelenině především pak v cibuli, pórků, česneku a šalotky, kde je jeho obsah 65 – 95 mg/100g [35].



Obrázek 11: Vzorec kvercetinu [17]

2.2.7 Flavanoly

Flavanoly se vyskytují v rostlinách ve formě monomerů, oligomerů a polymerů. Nejznámější a nejrozšířenější zástupci flavanolů jsou katechiny. Katechiny jsou v rostlinách jak ve volné, tak ve vázané formě. Jsou zodpovědné za zákaly vín, které jsou způsobeny jejich reakcí s bílkovinami. Ve vinných hroznech mají majoritní zastoupení jak v semenech, tak i ve slupce, zatímco v dužině je jejich množství stopové. Dále jsou katechiny ve švestkách, jablcích a čaji. Katechin se vyznačuje silnými antioxidačními účinky, působí proti hromadění tukových plátů a snižuje riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění [17, 35].



Obrázek 12: Vzorec katechinu [17]

2.2.8 Flavanony

Flavanony jsou světle žluté nebo bezbarvé glykosylované disacharidy. Flavanony jsou nazývány jako „citrusové“ flavonoidy, protože jsou obsaženy hlavně v citrusových plodech a to hlavně ve vrstvě hned pod slupkou, ale také v rajčatech nebo bylinách jako máta a lékořice. Mezi zástupce flavanonů patří hesperetin (5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavanon) vyskytující se hlavně v pomerančích, naringenin (5,7,4'-trihydroxyflavanon), který je obsažen hlavně v grapefruitech a eriodictyol obsažených hlavně v citróněch [21, 28].

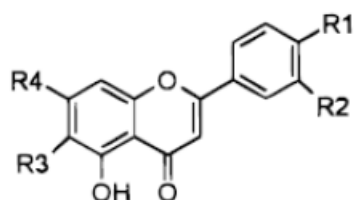
Sloučenina	R1	R2	R3
didymin	H	OCH ₃	ORut
eriocitrin	OH	OH	ORut
eridiktyol	OH	OH	OH
hesperetin	OH	OCH ₃	OH
hesperidin	OH	OCH ₃	ORut
isosakuranetin	H	OCH ₃	OH
naringenin	H	OH	OH
naringin	H	OH	ONeo
narirutin	H	OH	ORut
neoeriocitrin	OH	OH	ONeo
neohesperidin	OH	OCH ₃	ONeo
pinocembrin	H	H	OH
poncirin	H	OCH ₃	ONeo
prunin	H	OH	OGlc

rutinosa neohesperidosa

Obrázek 13: Strukturní vzorce flavanonů [34]

2.2.9 Flavony

Flavony jsou také žluté pigmenty rostlin nacházející se společně s flavonoly. Vyskytují se v nižších koncentracích než flavonoly a ve formě glykosidů nebo esterů. Strukturně jsou nejjednoduššími ze všech flavonoidů. Nejvýznamnějšími flavony jsou apigenin a luteolin. Nejčastějším zdrojem flavonů jsou citrusové plody, ale také byliny, červená paprika a celer [28].

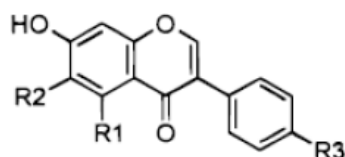


Sloučenina	R1	R2	R3	R4
apigenin	OH	H	H	OH
bajkalein	H	H	OH	OH
chrysin	H	H	H	OH
diosmin (výskyt: máta)	OCH ₃	OH	H	ORut
genkwanin	OH	H	H	OCH ₃
isorhoifolin	OH	H	H	ORut
luteolin	OH	OH	H	OH
rhoifolin	OH	H	H	ONeo
techtochrysin	H	H	H	OCH ₃

Obrázek 14: Strukturní vzorce flavonů [34]

2.2.10 Isoflavony

Struktura isoflavonolů je podobná estrogenům (skupina steroidů), protože obsahují v poloze 4 a 7 hydroxylové skupiny. Navázáním isoflavonu na estrogenové receptory dochází k produkci fytoestrogenu. Fytoestrogeny mají pozitivní účinky na lidský organismus, pomáhají při léčbě rakoviny prsu a prostaty či kardiovaskulárních onemocnění. Do současnosti bylo objeveno více jak 900 isoflavonů. Izoflavony slouží také jako přirozená ochrana rostlin proti napadení hmyzem, škůdci a infekcí [28].



Sloučenina	R1	R2	R3
biochanin A	OH	H	OCH ₃
daidzein	H	H	OH
formononetin	H	H	OCH ₃
genistein	OH	H	OH
glycitein	H	OCH ₃	OH

Obrázek 15: Strukturní vzorce isoflavonů [34]

2.3 Metody stanovení polyfenolických látek

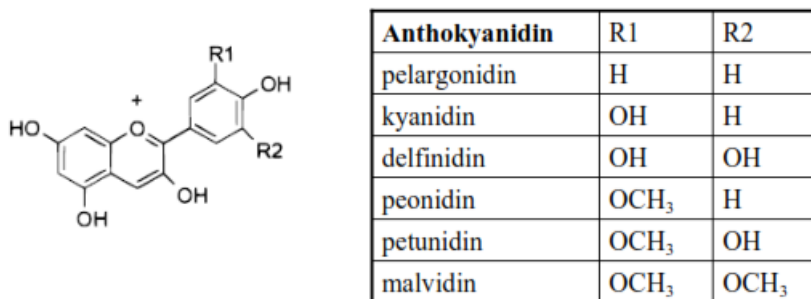
K stanovení polyfenolických látek v potravinách se používají často spektrofotometrické metody. Nejpoužívanější spektrofotometrická metoda je založená na chemické reakci Folin–Ciocalteova činidla s polyfenolickými látkami. Při reakci dochází k redukci činidla a ke změně jeho zbarvení. Tato změna se měří spektrofotometricky při vlnové délce 750 nm. Výsledek se vyjadřuje v ekvivalentech kyseliny gallové jakožto standartního roztoku. K dalším metodám patří, reakce s 4-aminoantipyridinem (AAPM), metoda podle Price a Butlera (PBM) a metoda redukce mědi (CUPRAC) [21].

2.4 Anthokyany

Anthokyany neboli anthokyaniny jsou rozsáhlou skupinou rostlinných barviv. Doposud bylo objeveno a identifikováno více jak 500 různých anthokyanů. Jsou příčinou zbarvení ovoce, zeleniny a květin, které jsou díky těmto látkám vizuálně atraktivnější.

2.4.1 Chemická struktura

Anthokyany jsou chemicky glykosidy různých alglykonů a jsou odvozeny od základní struktury, kterou je flavylový kation (2-fenylbenzopyrylylový). Všechny sloučeniny jsou v poloze C-4' substituovány hydroxylovou skupinou a v ostatních polohách (C-3, C-5, C-6, C-7, C-3' a C-5') se substituenty liší. V polohách C-5, C-7, C-3' a C-5' mohou být methoxyskupiny. Důležité potravinářské anthokyany jsou uvedeny na obrázku 16 [13, 19].



Obrázek 16: Chemická struktura vybraných anthokyanů [34]

Jako součásti molekul anthokyanů bylo identifikováno i pět sacharidů. Dle četnosti jejich výskytu to jsou: D-glukósa, L-rhamnosa, D-galaktósa, D-xylóza a L-arabinosa. Sacharidy

jsou na molekulu anthokyanu substituovány výhradně na poloze C-3. Pokud je glykosylována ještě další skupina, bývá to hydroxyl na C-5 (bývá to glukósa). Ve výjimečných případech může být cukr navázán i v poloze C-7, C-3', C-5' a C-4' jako mono di nebo trisacharid. Podle počtu navázaných molekul sacharidů lze anthokyany rozdělit do 18 skupin, z nichž nejvýznamnější jsou [19]:

- monosidy s glukosou, galaktosou, rhamnosou nebo arabinosou v poloze C-3 (3 monosidy)
- biosidy s disacharidy (rutinósa, sambubinoso) vázané v poloze C-3 (3-biosidy)
- triosidy s lineárními nebo rozvětvenými trisacharidy vázanými v poloze C-3 (3-triosidy)
- 3,5-diglykosidy s monosacharidy v poloze C-3 a C-5
- 3,7-diglykosidy s monosacharidy v poloze C-3 a C-7
- 3-biosidy-5-monosidy, u kterých je v polohách C-3 vázán disacharid a v poloze C-5 jednoduchý sacharid [19].

Na chemické vlastnosti barviv nemá vliv druh cukru, ale poloha, ve které je substituován. Cukry bývají často acylovány různými fenolovými kyselinami (kumarová, kávová, malonová či octová) na hydroxylovou skupinu glukózy v poloze C-6 a hydroxylovou skupinu rhamnosy v poloze C-4 [19].

2.4.2 Výskyt

Anthokyany jsou v rostlinném pletivu lokalizovány v buněčných vakuolách, kde jsou rozpuštěné ve vakuolárním roztoku epidermálních buněk a syntetizovány jsou v cytoplazmě pomocí multienzymového komplexu ukotveném na endoplazmatickém retikulu. V buněčných vakuolách jsou stabilizovány interakcemi ion-ion s organickými kyselinami (např. kyselinou maleinovou nebo kyselinou jablečnou). Významnými potravinářskými zdroji anthokyanů jsou plody rostlin čeledi révovitých (vinná réva) a růžovitých (maliny, jahody, třešně, švestky, jablka, ostružiny, či hrušky), rostliny z čeledi lilkovitých (lilek) a odrůdy brambor s červenou slupkou. Dalšími významnými zdroji jsou plody patřící do čeledi srstkovitých (červený a černý rybíz, červenoplodý angrešt), borůvky a brusinky patřící do skupiny vřesovcovitých a olivy [13, 19].

2.4.3 Anthokyan v odrůdách zimolezu

V plodech zimolezů jsou nejvíce zastoupeny glykosidy a rutinosidy kyanidinu, peonidinu, delphinidinu a pelargonidinu. Nejčastějšími jsou kyanidin-3-glukosid, kyanidin-3,5-diglukosid, peonidin-3,5-diglukosid, kyanidin-3-rutinosid a peonidin-3-glukosid. [37]

Tabulka 2: Procentuální zastoupení nejvýznamnějších anthokyanů [11, 37]

anthokyan	procentuální obsah
kyanidin-3-glukosid	79,0 – 88,0
kyanidin-3-rutinosid	1,0 – 11,0
kyanidin-3,5-diglukosid	2,2 – 6,4
peonidin-3-glukosid	2,8 – 4,5
peonidin-3-rutinosid	0,3 – 1,3
pelargonidin-3-glukosid	0,2 – 1,0

Tabulka 2 ukazuje procentuální zastoupení hlavních anthokyanů v *Lonicera caerulea* L. Obsah anthokyanů velmi závisí na podmínkách, kterým je rostlina vystavována, a to především na teplotě, světle, zdravotním stavu, míře zavlažování a stupni zralosti, proto se tyto hodnoty mohou značně lišit. Nejvíce anthokyanů je přítomno v plně zralých plodech. [11, 37]

2.4.4 Vlastnosti anthokyanů a faktory na ně působící

Nejdůležitějšími vlastnostmi anthokyanů jsou z technologického hlediska barva a stabilita. Tyto dvě vlastnosti, ale bývají zpravidla nízké, jelikož existuje mnoho faktorů, které je mohou nepříznivě ovlivnit. Nejvýznamnějšími faktory, ovlivňující stabilitu a barvu molekul anthokyanů, jsou teplota, struktura molekuly, pH prostředí, přítomnost některých enzymů, přítomnost kyslíku a působení záření. [19]

2.4.4.1 Vliv teploty

Většina anthokyanů vykazuje při vyšších teplotách zvýšenou stabilitu. Tento jev se vysvětluje ochranným efektem různých složek systému s kondenzací monomerů. Zvýšení teploty a delší doba skladování má za následek tvorbu a zvětšující se množství stabilnějších

oligomerních pigmentů, které vznikají z monomerů. Tyto oligomerní jednotky jsou významnými nositeli barvy především ovocných šťáv a červených vín. [19]

2.4.4.2 Vliv struktury molekuly

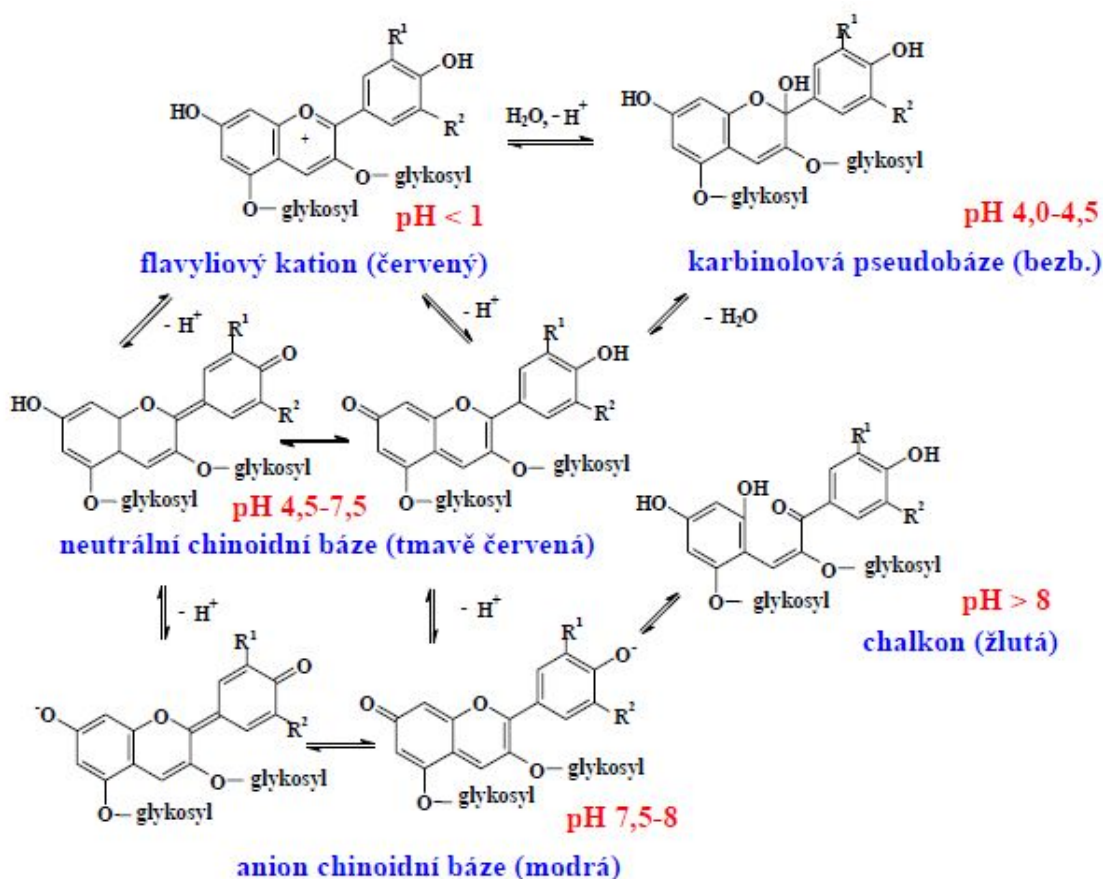
Struktura molekuly anthokyanu má vliv na její zbarvení. V kyselém prostředí je barva neacylovaných a monoacylovaných molekul anthokyanů závislá hlavně na počtu a druhu substituentů anthokyanidinu. Anthokyanidiny, které obsahují větší počet hydroxylových skupin, mají spíše modrou barvu, deriváty s methoxyskupinami jsou spíše červené. Acylderiváty glykosidů a glykosidy mají modré zbarvení. Druh substituentu má také vliv na stabilitu anthokyanu. Deriváty s vyšším počtem hydroxylových skupin jsou méně stabilní, zatímco deriváty s rostoucím počtem methoxyskupin jsou stabilnější. Vliv na konečnou stabilitu má i druh navázaného cukru [19].

2.4.4.3 Vliv pH prostředí

Barva a stabilita anthokyanů je ve vodném prostředí závislá na pH. Vlivem pH prostředí, dochází k transformacím mezi pěti různými strukturami aglykonů:

- červeným flavyliovým kationtem,
- bezbarvou karbinolovou pseudobází,
- purpurově červenou neutrální chinonovou bází,
- modrou chinoidní bází,
- žlutě zbarveným chalkonem

V prostředí o pH 1,0 a nižším mají anthokyany výhradně červené zbarvení flavyliové soli. Při zvyšujícím se pH dochází k postupnému odbarvování a ke slábnutí červené barvy. Při pH 4,0-4,5 jsou anthokyany bezbarvé. Dalším zvýšením hodnoty pH dojde k postupnému opětovnému červenému purpurovému zbarvení, jenž vzniká v důsledku tvorby neutrální chinoidní báze. V slabě zásadité oblasti (pH 7,5-8,0) dochází ke vzniku modrého zbarvení, jenž vlivem dalšího zvýšení pH přejde do podoby žlutého chalkonu [19].



Obrázek 17: Vliv pH na zbarvení molekuly anthokyanu [38]

2.4.4.4 Další vlivy

Dalším faktorem ovlivňujícím barvu anthokyanů je působení skupin enzymů. První skupinou jsou glykosidasy, které hydrolyzují glykosidové vazby anthokyanů za vzniku příslušného cukru a alkykonu, který je nestabilní a přechází do bezbarvé podoby. Druhou skupinou enzymů jsou polyfenoloxidas, které působí při enzymovém hnědnutí.

Nestabilitu anthokyanových barviv zvyšuje působení viditelného, ultrafialového nebo ionizujícího záření. Toto dopadající záření vyvolává nežádoucí fotooxidační změny, které se projevují rozkladem molekuly [19].

2.4.5 Anthokyany a jejich funkce v živém organismu

Anthokyany mají v důsledku své rozsáhlé biologické aktivity řadu pozitivních účinků na lidský organismus. Vzhledem k jejich snadné dostupnosti jsou anthokyany důležitým faktorem při prevenci onemocnění. Mají významné a silné antioxidační, antimikrobiální, protinádorové a protizánětlivé účinky. Jejich antioxidační aktivita je při stejné koncentraci dokonce vyšší nežli u vitamínu C. Kyanidin má dokonce 4x větší antioxidační účinek než

vitamín C. Anthokyany mají nejvyšší antioxidační účinky ze všech flavonoidů, přičemž jako nejúčinnější se jeví kyanidin a delphinidin. Antioxidační aktivita je dána přítomností hydroxylové skupiny v pozici 3 v C kruhu a acylací zbytků sacharidů aromatickými kyselinami ještě roste [39].

Anthokyany dokáží díky své antioxidační schopnosti bránit oxidaci DNA, neenzymatické peroxidaci lipidů nebo enzymatické peroxidaci lipidů, kde fungují jako nekompetitivní inhibitory. Zmírňují zánětlivá onemocnění tím, že neutralizují enzymy a deaktivují oxidanty, které poškozují krevní tkáň. Dále chrání krevní řečiště tím, že zabrání oxidaci cholesterolu (LDL), a tím i poškození cévních buněk a vzniku aterosklerózy a později i ischemické srdeční choroby způsobené ukládáním aterosklerotických plátek do koronárního řečiště. Dále jsou účinné při různých alergických reakcích, které jsou vyvolány serotoninem či histaminem.

Pozitivní vliv mají i na diabetes. Jejich účinek se projevuje v ochraně mikrocévního systému před nadměrným množstvím cukru v krvi. Kromě toho také pomáhají při retinopatii, která může způsobit i slepotu. Další funkcí anthokyanů je zvyšovat schopnost adaptace oka na světlo a tmu. Některé anthokyany mají protinádorové účinky. Delphinidin, malvidin a petunidin inhibují růst rakovinných buněk odvozených od různých tkání včetně tlustého střeva, prsu, krve a plic již v mikromolárních koncentracích [19, 40, 41].

2.4.6 Metody stanovení anthokyanů

K stanovení obsahu anthokyanů se v minulosti používala papírová chromatografie (PC) a tenkovrstvá chromatografie (TLC). V současné době se spíše využívají vysokoúčinná kapalinové chromatografie s UV detektorem, či spektrofotometrické metody [21].

2.4.6.1 pH diferenciální metoda

pH diferenciální metoda využívá spektrofotometrii. Je založena na změně pH, při které dojde ke změně struktury, a tím i ke změně zbarvení anthokyanů. Tato změna se měří na spektrofotometru při vlnových délkách 510 a 700 nm. Koncentrace anthokyanů se vypočítá na základě rozdílu absorbancí. Interferující látky se změnou pH barvu nezmění a do výpočtu se nezahrnou [42].

2.4.6.2 Chromatografické metody

Chromatografie patří mezi separační metody, svým určením je to za vhodných podmínek metoda kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku. Vzorek je zde vnášen mezi dvě navzájem nemísitelné fáze, které se nazývají stacionární fáze (nepohyblivá fáze) a mobilní fáze (pohyblivá fáze). Separace vzorku je založena na různé míře zachycování vzorku na stacionární fázi, přes kterou proudí mobilní fáze a vzorek je touto fází unášen. Ty složky, které mají větší afinitu k stacionární fázi, se budou mobilní fází pohybovat pomaleji. Tím dojde k rozdělení vzorku na jednotlivé složky a na konec stacionární fáze se nejprve dostanou složky, které nejsou tolik poutány k stacionární fázi a mobilní fází jsou unášeny rychleji [18, 43, 44].

Ke stanovení anthokyanů je nejpoužívanější chromatografie s reverzní fází (stacionární fáze je nepolární a mobilní fáze je polární). Mobilní fáze je tvořena vodou a organickou kyselinou. Organické kyseliny zvyšují stabilitu anthokyanů při analýze tím, že snižují jejich pH pod hodnotu 2, a tím nedochází k rozšiřování a chvostování píků [45, 46].

Dále se využívá spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí v konfiguraci HPLC/MS s elektrosprejovou ionizací a *time of flight* detektorem (ESI – TOF). K dalším chromatografickým metodám patří HPLC s detekcí diodovým polem, vysokoúčinná kapalinová chromatografie s nukleární magnetickou rezonancí (HPLC/NMR). Tato metoda je méně citlivá nežli předešlé metody [45, 46].

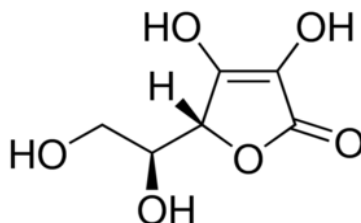
2.4.6.3 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je nejjednodušší elektromigrační metoda použitelná pro separaci a stanovení anorganických a organických látek, jejichž molekuly mohou v důsledku disociace nést buď záporný náboj, nebo kladný náboj a nehodí se tudíž pro separaci a stanovení neutrálních molekul. Metoda je vhodná pro separaci a stanovení iontů lišících se různou molekulovou hmotností, nábojem či tvarem. CZE dělí molekuly s nábojem na základě jejich rozdílných elektroforetických pohyblivostí. Kladné i záporné ionty jsou vlivem elektroosmotického toku unášeny tlumivým roztokem uvnitř kapiláry k detektoru a vlivem rozdílných elektroforetických rychlostí se vzájemně dělí. Při jednom pokusu je možno vzájemně dělit a stanovovat oba dva druhy iontů. Analyzované látky se detekují většinou UV/VIS detektory [43, 47].

2.5 Vitamín C

Chemicky byl vitamín C popsán roku 1933 a triviální název kyselina askorbová se začal používat až o pár let později. Kyselina askorbová má formu bezbarvých růžicovitých krystalků, dobře se rozpouští ve vodě, slabě rozpustná je v nižších alkoholech. Kyselina askorbová vzniká z derivátu glukózy působením enzymu gulonolakton-oxidaza. Tento enzym je nezbytný pro syntézu kyseliny askorbové v organismu a člověk, primáti a další druhy zvířat tento enzym v těle nemají. Musejí tudíž přijímat kyselinu askorbovou z potravy [36, 49].

Kyselina askorbová se řadí, společně s kyselinou dehydroaskorbovou, do skupiny látek s účinností vitamínu C. V organismu může jedna forma přecházet v druhou. Vlivem tohoto oxidačně redukčního systému dochází v organismu k inaktivaci volných radikálů, a tím chrání organismus před poškozením a ontogenezí [49].



Obrázek 18: Chemická struktura kyseliny askorbové [50]

2.5.1 Význam vitamínu C v lidském organismu

Vitamín C je důležité antioxidační činidlo, které chrání tělo proti působení volných kyslíkových radikálů, které vznikají v organismu při metabolických pochodech. Tyto volné radikály způsobují poškození lipidů, enzymů, bílkovin, nukleových kyselin a nízkomolekulárních látek (polyfenoly). Vitamín C také recykluje oxidovaný vitamín E do počáteční aktivní formy. Tato schopnost redukovat oxidovaný vitamín E poskytuje společně se schopností redukovat hyperperoxidové radikály ochranu proti kardiovaskulárním onemocněním a onemocněním myokardu. Hyperperoxidové radikály v organismu oxidují LDL cholesterol a krevní tuky a zároveň snižují hladinu vitamínu E, což má za následek tvorbu aterosklerotických plátek v krevním řečišti [36, 51].

Vitamín C také zabraňuje akumulaci lipoproteinu A, který je nositelem cholesterolu (LDL) a je zodpovědný za jeho akumulaci v tepnách. Vlivem zvýšené akumulace cholesterolu dochází ke tvorbě aterosklerotických plátek v krevním řečišti. Dodávání vitamínu C snižuje celkovou hladinu cholesterolu v krvi a uvádí se, že mírně snižuje i krevní tlak [51].

Vitamín C je nezbytný pro správné fungování imunitního systému a funkci bílých krvinek. Funguje jako prevence před onemocněním z nachlazení a studie prokázaly, že došlo i ke zkrácení doby léčení u nakažených lidí. Vitamín C lze v současné době využít i k léčbě nádorových onemocnění jako alternativa k současné chemoterapii. Vědci a lékaři studovali vliv vitamínu C na růst a bujení nádorových buněk v organismu. Zjistili, že vitamín C spolu s vitamínem K₃ (menadionem) v poměru 100:1 je velmi užitečný jako příprava na chemoterapii, zajistí odumírání nádorových buněk mezi etapami chemoterapie i po jejím skončení [52].

K dalším vlastnostem vitamínu C patří schopnost snižovat hladinu histaminu v krvi (podobně jako antokyany), a tím zmírňovat průběh alergických reakcí. Dále je potřebný k syntéze kolagenu, který je nezbytnou součástí pojivových tkání, kostí, chrupavek, oční tkáně, zubů a kůže. Tvorba kolagenu je také důležitá při hojení ran a při jeho nedostatku se snižuje soudržnost a pohyblivost podpůrných tkání. Vitamín C je dále schopen čistit organismus od těžkých kovů tím, že je dokáže udržet v kapalném roztoku a tím mohou být z těla vyloučeny ledvinami. V neposlední řadě se podílí na nejrůznějších metabolických procesech, syntéze hormonů, aminokyselin a dalších metabolických látek [51, 52].

2.5.2 Metody stanovení kyseliny askorbové

K stanovení kyseliny askorbové lze využít široké spektrum metod, od jednoduchých titrací až po složité přístrojové techniky.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – nejčastěji se používá v konfiguraci RP – HPLC (chromatografie s reverzní fází) z důvodu polárního charakteru kyseliny askorbové. Další metodou je **iontově výměnná chromatografie**, ta využívá faktu, že kyselina askorbová je slabou kyselinou a je dobře zachytávána silným anexem. Tato metoda byla jednou z prvních metod využitých k analýze kyseliny askorbové. K dalším chromatografickým technikám patří **iontově párová chromatografie**, **iontově vylučovací chromatografie** a **hydrofilní chromatografie** [53].

K dalším metodám patří spektrofotometrické stanovení kyseliny askorbové využívající reakce s 2,4-dinitrofenylhydrazínem. Kyselina askorbová absorbuje UV záření při vlnových délkách (245 – 270 nm) [54, 55].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Popis vzorků

Všechny zkoumané vzorky plodů vybraných odrůd zimolezu pochází ze Školního zemědělského podniku Mendelovy university Žabčice z roku 2014. Jedná se o tyto testované odrůdy: Maistar, Goluboje vereteno, Tomička, Remont, Průhonická 9, Kamtschatica, Blue Velved, D altaj, Lipnická, Fialka, Helfštýn, Amur, Průhonický a, b, c, Průhonický letní, Valchova, Morena, Gerda, Leningradský velikán, Kamčadalka, Bakcarská, Lebeduška, Zoluška, Malion, Vasjuganská, Viola, Modrý Triumph, Sinnaja Ptica a Amfora.

3.2 Laboratorní vybavení a přístroje

Pomůcky:

- laboratorní sklo (kádinky, nálevky, zkumavky, odměrné baňky, odměrné válce, Erlenmayerovy baňky aj.)
- Büchnerova nálevka
- stojan na zkumavky
- stříčka, lžička
- mikrofiltry
- kyvety
- centrifugační kyvety
- automatické pipety
- filtrační papír
- odsávací baňka

Přístroje:

- analytické váhy (Boeco; Japonsko),
- ruční homogenizátor (Ultra Turrax T18 Basic; IKA Německo),
- centrifuga (T 52.1; IKA Německo),
- pH metr (Monokrystaly Turnov; Česká Republika),
- ultrazvuková lázeň (NETZ Kraintek; Německo),
- spektrofotometr Heλios Delta (Spectronic Unicam; Velká Británie),

- HPLC přístroj (Shimadzu; Japonsko)
 - pumpa – LC-10AD
 - detektor SPD-M10AVP
 - degaser – GT-104
 - software – CLASS LC,
- magnetická míchačka,
- vývěva (KNF LAB Laboport),
- vortex (TTS 2 Yellow line)

Chemikálie

- ***stanovení celkových polyfenolických látek***
 - 7,5% roztok uhličitanu sodného,
 - kyselina gallová (p.a.),
 - Folin Ciocalteuovo činidlo,
 - destilovaná voda.
- ***stanovení anthokyanů***
 - 0,025 M chlorid draselný,
 - kyselina chlorovodíková,
 - 0,4M octan sodný,
 - destilovaná voda.
- ***stanovení vitamínu C***
 - dihydrogenfosforečnan draselný,
 - methanol,
 - redestilovaná voda,
 - kyselina metafosforečná,
 - kyselina askorbová.

3.3 Stanovení celkových polyfenolických látek pomocí Folin – Ciocaltauova činidla

Příprava 7,5% roztoku uhličitanu draselného

Na analytických vahách bylo naváženo 7,5 g uhličitanu sodného, který byl kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a destilovanou vodou doplněn po rysku.

Příprava zásobního roztoku kyseliny gallové

Pro přípravu zásobního roztoku kyseliny gallové o koncentraci $1000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ bylo v kádince rozpuštěno 0,025 g kyseliny gallové v destilované vodě. Obsah kádinky byl kvantitativně převeden do odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

Příprava vzorku

Do odměrné baňky bylo naváženo s přesností na 4 desetinná místa 5 g zmražených plodů zimolezu. Vzorek byl zhomogenizován, kvantitativně převeden do 50 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku. Vzorky byly ihned po doplnění uskladněny v lednici a byly vyjmuty pouze před samotnou analýzou. Před analýzou byla suspenze odstředěna na odstředivce a přefiltrována přes Büchnerovu nálevku.

Příprava kalibrační řady

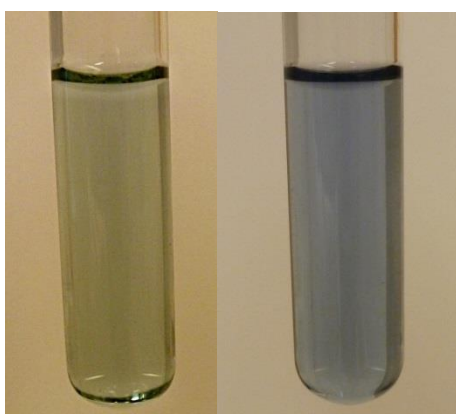
K vytvoření kalibrační řady se používal zásobní roztok kyseliny gallové o koncentraci $1000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Z tohoto zásobního roztoku bylo do pěti odměrných baněk postupně mikropipetou napipetováno 0,125; 0,25; 0,5; 1 a 2 ml zásobního roztoku. Toto množství odpovídalo koncentracím 12,5; 25; 50; 100 a $200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Do zkumavek bylo napipetováno 0,1 ml Folin – Ciocaltauova činidla, 1,8 ml destilované vody a 0,1 ml jednotlivých standardů. Obsah zkumavek byl promíchán na vortexu a ponechán 5 minut stát. Poté bylo ke směsi napipetováno 1 ml 7,5% roztoku uhličitanu sodného a obsah zkumavky byl opět promíchán na vortexu. Po dvou hodinách stání byl vzorek proměřen na spektrofotometru při vlnové délce 750 nm.



Obrázek 19: Spektrofotometr Helios

Měření vzorků

Do tří zkumavek bylo napipetováno 0,1 ml Folin – Ciocalteuova činidla, 1,8 ml destilované vody a 0,1 ml vzorku. Vzorky zimolezů byly před samotným měřením pětkrát zředěny (poměr 1:4). Vzniklá směs byla promíchána na vortexu a ponechána 5 minut stát. Po pěti minutách byl ke vzorku přidán 1 ml 7,5% roztoku uhličitanu sodného a jeho obsah byl opět promíchán a ponechán 2 hodiny stát. Po 2 hodinách byl vzorek přelit do kyvety a změřena jeho absorbance na spektrofotometru Helios při vlnové délce 750 nm. Měření absorbance bylo prováděno proti slepému vzorku, který byl připraven stejným způsobem, akorát místo 0,1 ml vzorku bylo přidáno 0,1 ml destilované vody. Měření bylo prováděno 3x a koncentrace polyfenolů byla vypočítána z regresní rovnice kalibrační závislosti.



Obrázek 20: Zbarvení vzorků pro stanovení celkových polyfenolů ihned po přípravě a po 2 hodinách čekání

3.4 Stanovení anthokyanů v plodech zimolezu

Příprava roztoku 0,25 M chloridu draselného o pH 1,0

Navážka 1,86 g chloridu draselného byla převedena do kádinky a rozpuštěna v 950 ml destilované vody. Koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou bylo pH upraveno na 1,0. Poté byl objem převeden do 1000 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku.

Příprava roztoku 0,4 M octanu sodného o pH 4,5

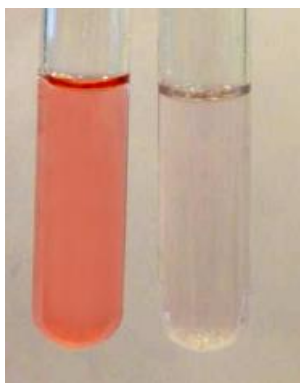
Navážka 54,43 g octanu sodného byla převedena do kádinky a rozpuštěna v 950 ml destilované vody. Koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou bylo pH upraveno na 4,5, objem byl převeden do 1000 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku.

Příprava vzorků

Do odměrné baňky bylo naváženo s přesností na 4 desetinná místa 5 g zmrzlých plodů zimolezu. Vzorek byl zhomogenizován, kvantitativně převeden do 50 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku. Vzorky byly ihned po doplnění uskladněny v lednici a byly vyjmuty pouze před samotnou analýzou. Před analýzou byla suspenze odstředěna na odstředivce a přefiltrována přes Büchnerovu nálevku.

Analýza vzorků

Pro každou odrůdu bylo použito 6 zkumavek. Do tří z nich bylo napipetováno 2,5 ml pufru o pH 1,0 a 0,5 ml ředěného vzorku. Vzorek byl ředěn 5x. Bylo přidáno 0,1 ml vzorku a 0,4 ml pufru. Do dalších třech zkumavek bylo napipetováno 2,5 ml pufru o pH 4,5; 0,1 ml vzorku a 0,4 ml pufru o pH 4,5. Obsah zkumavek byl promíchán na vortexu a proměřen na spektrofotometru při vlnových délkách 510 a 700 nm. Slepý vzorek byl připraven stejným způsobem, ale objem vzorku byl nahrazen stejným objemem destilované vody.



Obrázek 21: Porovnání zbarvení vzorků zimolezu pro stanovení anthokyanů při různých hodnotách pH. Vlevo roztok o pH 1,0 a vpravo roztok o pH 4,5

Z naměřených absorbancí byla vypočítána výsledná absorbance A ředěných roztoků podle vztahu:

$$A = (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 1,0} - (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 4,5} \quad (1)$$

Koncentrace celkových monomerního pigmentu kyanidin 3- glukosidu byla vypočítána podle vztahu:

$$C_{MA} = \frac{A \cdot M \cdot F \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l} [mg \cdot l^{-1}] \quad (2)$$

C_{MA} – výsledná koncentrace monomerního pigmentu

A – absorbance vzorku

M – molekulová hmotnost kyanidin 3-glukosidu ($449,2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)

F – faktor zředění

ε – molární extinkční koeficient pro dominantní anthokyan [$\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$]

l – délka kyvety

Výsledné koncentrace byly vyjádřeny v $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$, přepočítány na navážku původního vzorku a vyjádřeny v $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ podle vztahu:

$$c = \frac{V \cdot 0,1 \cdot c_{MA}}{m} [\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}] \quad (3)$$

- c – celkový obsah monomerního anthokyanu ve 100 g plodů
 c_{MA} – koncentrace monomerního pigmentu anthokyanu vypočtená dle vztahu 3.
 V – objem šťávy [ml]
 m – hmotnost navážky plodů [g]

3.5 Stanovení vitamínu C vysoce-účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC)

Příprava mobilní fáze

Pro přípravu mobilní fáze dihydrogenfosforečnanu draselného a metanolu v poměru 9:1 bylo naváženo na analytických vahách 13,6025 g KH_2PO_4 . Navážka byla rozpuštěna v 900 ml redestilované vody a následně bylo přidáno 100 ml methanolu.

Příprava 2% roztoku kyseliny metafosforečné

Navážka 17 g kyseliny metafosforečné byla rozpuštěna ve 250 ml redestilované vody a zahřívána do úplného rozpuštění. Poté byl roztok ochlazen a převeden do 500 ml odměrné baňky a doplněn redestilovanou vodou po rysku.

Příprava standartního roztoku kyseliny askorbové

Na analytických vahách bylo naváženo s přesností na 4 desetinná místa 0,0250 g kyseliny askorbové. Navážené množství bylo rozpuštěno v 20 ml 2% roztoku kyseliny metafosforečné, převedeno do 25 ml odměrné baňky a doplněno 2% roztokem kyseliny metafosforečné po rysku.

Sestrojení kalibrační křivky

Ze standartního roztoku kyseliny askorbové bylo do třech 10 ml odměrných baněk odpipetováno 0,01 ml; 0,1 ml a 0,4 ml roztoku. Tato množství odpovídají koncentracím 1; 10 a 40 mg·l⁻¹. Odměrné baňky byly doplněny 2% roztokem kyseliny metafosforečné po rysku. Roztoky byly po celou dobu uchovávány v lednici a vyjmuty pouze před samotnou analýzou.

Příprava vzorků

Z každé odrůdy bylo naváženo množství 4,7 g zmrzlých plodů zimolezu s přesností na 4 desetinná místa. Do vzorku bylo přidáno malé množství 2% roztoku kyseliny metafosforečné a následně byl vzorek zhomogenizován na homogenizátoru. Vzniklá suspenze byla kvantitativně převedena do 50 ml odměrné baňky a doplněná 2% roztokem kyseliny metafosforečné po rysku. Poté byl vzorek přefiltrován přes Büchnerovu nálevku a vzniklý filtrát byl uchován v lednici až do samotné analýzy. Těsně před analýzou byl vzorek znovu přefiltrován přes mikrofiltr a až poté nadávkován do chromatografického systému.

Chromatografické podmínky

Vlastní měření bylo prováděno na koloně Gemini C18 s rozměry 150x4,6 mm a velikostí částic 5 µm. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml·min⁻¹. Teplota termostatu byla přednastavena na 30°C a tato teplota byla udržována po celou dobu měření. Velikost nástriku vzorku byla 10 µl. Detektorem byl UV detektor s přednastavenou vlnovou délkou 254 nm.



Obrázek 22: HPLC soustava

Výpočty a stanovení celkového množství vitamínu C

Ze vzorků standardů kyseliny askorbové byla sestrojena kalibrační křivka s rovnicí regrese. Hodnoty kalibrační křivky se odečetly z plochy jednotlivých píků. Ze tří nástřiků vzorku byla vypočtena pomocí plochy píku a rovnice regrese z kalibrační řady koncentrace kyseliny askorbové ve vzorku (v $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Vypočtené koncentrace byly přepočítány dle vztahu (4) na navážku v původním roztoku a následně vyjádřeny v mg na 100 g plodů. Z těchto tři výsledných hodnot byl závěrem vypočten průměrný konečný výsledek.

$$c = \frac{x \cdot V \cdot F \cdot 0,1}{m} [\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}] \quad (4)$$

- c – koncentrace vitamínu C přepočtená na 100 g plodů
- V – původní objem vzorku (50 ml)
- x – koncentrace vitamínu C odečtená z kalibrační řad a rovnice regrese [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]
- m – navážka pro daný vzorek [g]

3.6 Statistické zpracování výsledků

3.6.1 Hodnocení přesnosti měření

Směrodatná odchylka s

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad (5)$$

x_i – naměřená hodnota

\bar{x} – aritmetický průměr

n – počet měření

Relativní směrodatná odchylka s_r

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 [\%] \quad (6)$$

\bar{x} – aritmetický průměr

s – směrodatná odchylka

Interval spolehlivosti $L_{1,2}$

$$L_{1,2} = \bar{x} \pm K_n \cdot R \quad (7)$$

K_n – kritická hodnota Lordova rozdělení pro zvolenou hladinu statistické významnosti α

L_1, L_2 – krajní meze intervalu spolehlivosti

\bar{x} – aritmetický průměr

R – variační rozpětí

3.6.2 Hodnocení hrubých chyb

Dean – Dixonův test Q_m

$$Q_m = \frac{x_n - x_{n-1}}{R} \quad (8)$$

R – variační rozpětí

Vypočítané hodnoty se porovnají s tabelovanou kritickou hodnotou Dean-Dixonova kritéria $Q(n, \alpha)$. V případě, že je vypočítaná hodnota větší nežli kritická hodnota, je nutné ji vyloučit, protože je zatížena hrubou chybou.

Variační rozpětí

$$R = x_{\max} - x_{\min} \quad (9)$$

x_{\max} – nejvyšší naměřený výsledek

x_{\min} – nejnižší naměřený výsledek

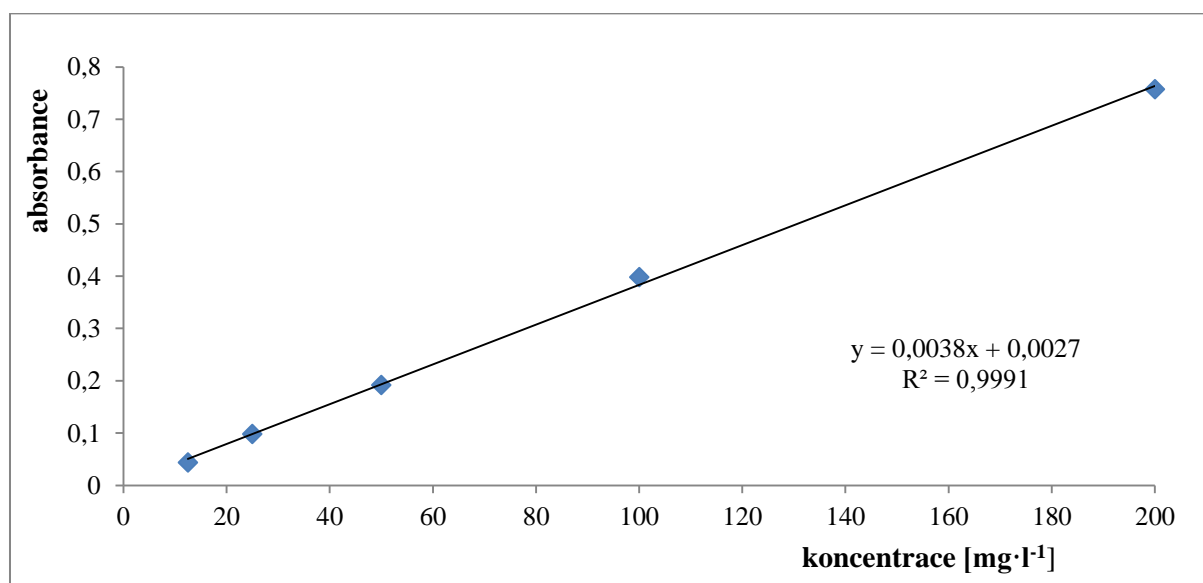
4 Výsledky a diskuze

4.1 Stanovení celkových polyfenolických látek

Pro stanovení celkového obsahu polyfenolických látek byly analyzovány plody 27 odrůd zimolezu. Každá odrůda pocházela ze sklizně z roku 2014 ze Školního zemědělského podniku Mendelovy Univerzity v Žabčicích. Literatura uvádí, že obsah celkových polyfenolických látek v zimolezu se pohybuje v rozmezí od 400 do 1500 mg.100 g⁻¹. Koncentrace ekvivalentů kyseliny gallové byly vypočítány z kalibrační závislosti a výsledky byly uvedeny v tabulkách v mg na 100 g vzorku.

4.1.1 Kalibrační křivka

Kalibrační křivka byla sestrojena dle postupu uvedeném v kapitole 3.3. Z kalibrační řady byla vygenerována rovnice regrese, která byla následně použita pro výpočty koncentrace analyzovaných vzorků.



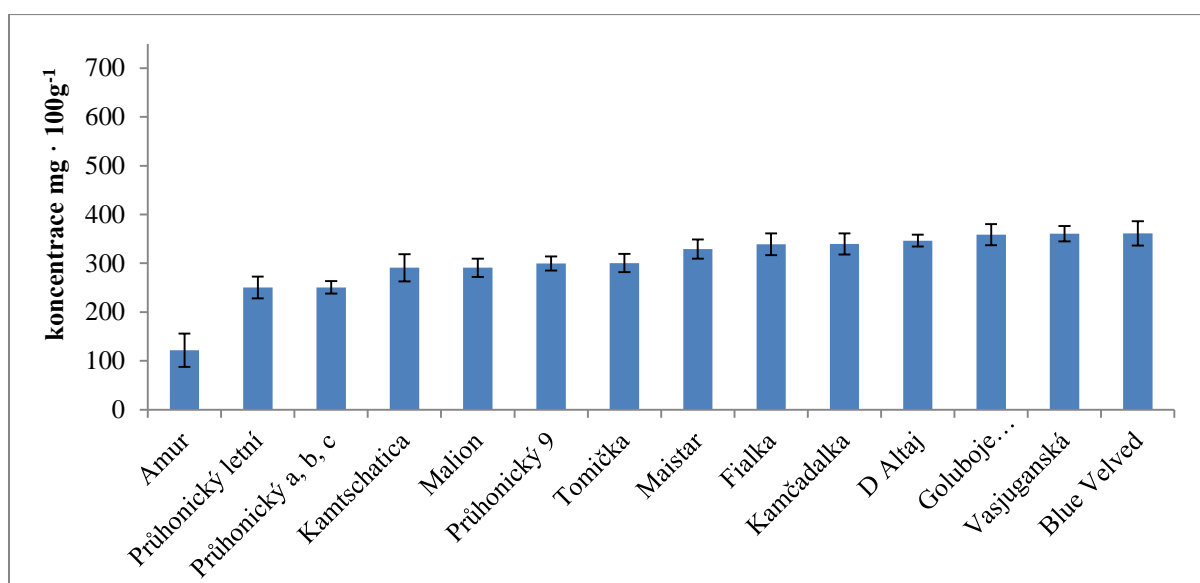
Graf 1: Kalibrační řada pro stanovení celkových polyfenolických látek

4.1.2 Naměřené a vypočítané hodnoty polyfenolických látek

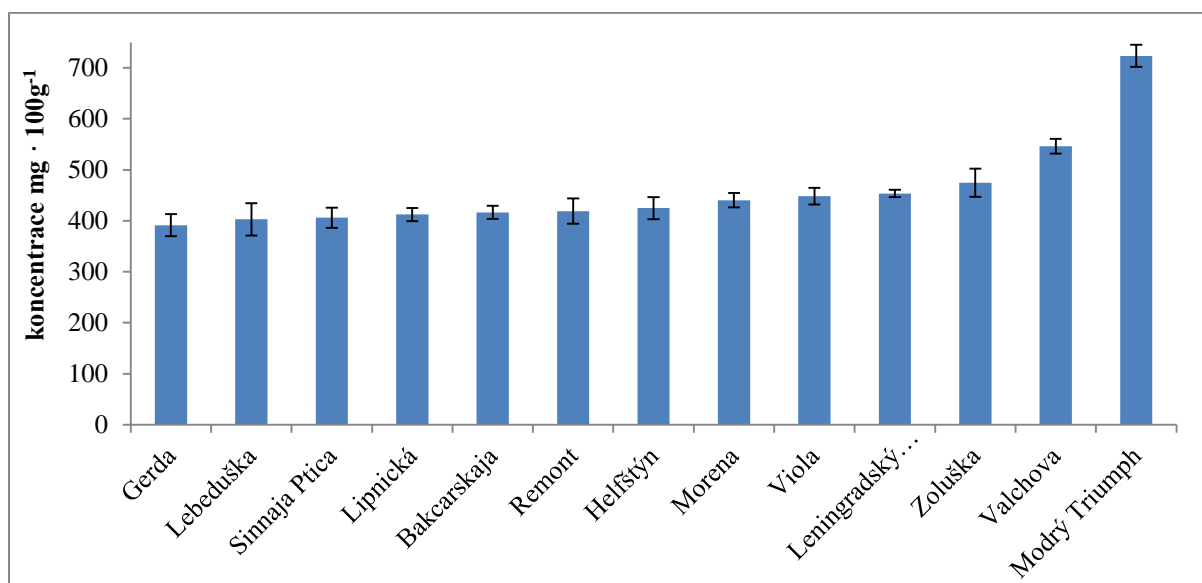
Tabulka 3: průměrné hodnoty absorbancí při vlnové délce 750 nm a vypočítané hodnoty koncentrací polyfenolů v odrůdách zimolezu

odrůda	průměrné hodnoty absorbance A [nm]	průměrná koncentrace polyfenolů [mg.100 g ⁻¹]
Amur	0,098	122,0 ± 34,3
Průhonický letní	0,196	250,3 ± 22,2
Průhonický a, b, c	0,198	250,6 ± 12,8
Kamtschatica	0,225	290,9 ± 27,8
Malion	0,237	291,0 ± 18,8
Průhonický 9	0,260	299,6 ± 14,2
Tomička	0,239	300,6 ± 18,5
Maistar	0,256	329,2 ± 19,8
Fialka	0,276	339,0 ± 22,2
Kamčadalka	0,260	339,8 ± 21,6
D Altaj	0,268	346,4 ± 12,3
Goluboje vereteno	0,284	358,7 ± 21,6
Vasjuganská	0,280	360,7 ± 15,5
Blue Velved	0,297	361,4 ± 24,9
Gerda	0,299	391,3 ± 21,6
Lebeduška	0,326	402,9 ± 31,6
Sinnaja Ptica	0,311	406,1 ± 19,8
Lipnická	0,318	412,2 ± 12,8
Bakcarskaja	0,319	416,4 ± 12,8
Remont	0,326	419,0 ± 24,6
Helfštýn	0,328	424,9 ± 21,6
Morena	0,343	440,3 ± 14,2
Viola	0,358	448,1 ± 16,3
Leningradský velikán	0,365	453,5 ± 7,1
Zoluška	0,385	474,6 ± 27,8
Valchova	0,442	546,3 ± 14,2
Modrý Triumph	0,551	723,6 ± 21,6

Celkový obsah stanovení polyfenolických látek se v odrůdách zimolezů pohyboval v rozmezí od 122 až po 723 mg·100 g⁻¹ plodů. Nejnižší obsah polyfenolických látek měla odrůda Amur (122,0 ± 34,3) a největší obsah (723,6 ± 21,6 mg·100 g⁻¹) měla odrůda Modrý Triumph. U většiny odrůd se obsah polyfenolických látek pohyboval od 300 – 500 mg·100 g⁻¹ plodu. Výsledky jsou seřazené od odrůdy s nejnižším obsahem celkových polyfenolických látek po největší obsah. Kvůli velkému počtu vzorků byly výsledky vyneseny do 2 grafů.



Graf 2: Srovnání celkového obsahu polyfenolických látek v jednotlivých odrůdách zimolezu



Graf 3: Srovnání celkového obsahu polyfenolických látek v jednotlivých odrůdách zimolezu

Grafy 2 a 3 znázorňují srovnání celkového obsahu polyfenolických látek v jednotlivých odrůdách zimolezu. Chybové úsečky zobrazené u hodnot značí interval spolehlivosti daného měření a výsledku. Z grafů je patrný rozdíl mezi odrůdami, odrůda Modrý Triumph má téměř šestkrát větší zastoupení polyfenolických látek, nežli odrůda Amur, která jich má nejméně. Významnými odrůdami s vysokým obsahem polyfenolických látek jsou také odrůdy Valchova a Zoluška. Celkově se dá říci, že obsah polyfenolických látek byl u většiny odrůd nižší, nežli je psáno v odborné literatuře. To mohlo být způsobeno jinými klimatickými podmínkami, stupněm zralosti plodů a dalšími faktory.

4.2 Stanovení anthokyanů

Anthokyaniny v různých odrůdách zimolezů byly stanovovány podle metodiky uvedené v kapitole 3.4. Pro výpočet konečné absorbance byl použit vzorec (1) a podle vzorců (2) a (3) byl výsledek přepočítán na $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ plodů. Bylo analyzováno 27 vzorků odrůd zimolezu.

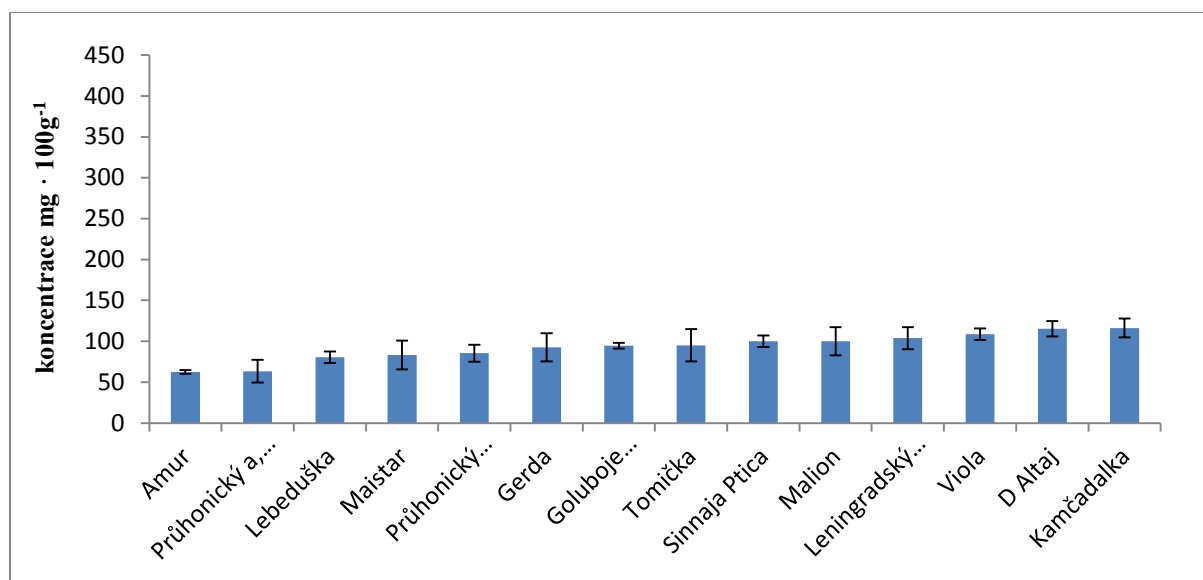
4.2.1 Stanovení anthokyanů v plodech zimolezu

Tabulka 4: Naměřené hodnoty absorbancí při pH 1 a pH 4,5 při vlnových délkách 510 a 700 nm a vypočítané hodnoty koncentrací anthokyanů v $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ v odrůdách zimolezu. Odrůdy jsou seřazeny podle velikosti od nejmenší po největší obsah anthokyanů.

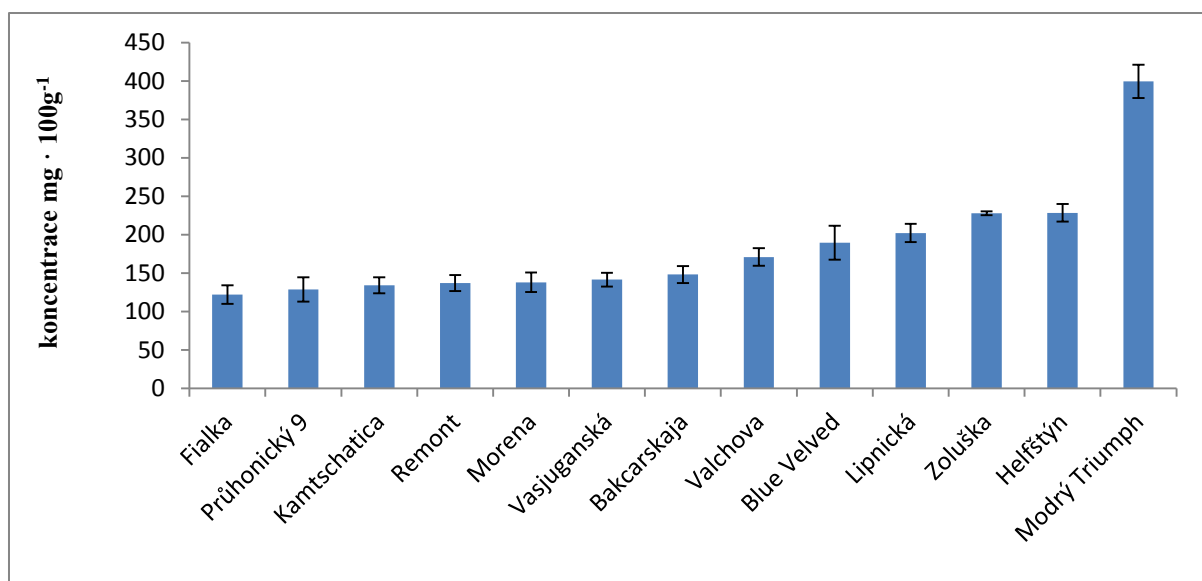
odrůda	průměrné hodnoty absorbance A [nm] při pH 1		průměrné hodnoty absorbance A [nm] při pH 4,5		průměrná koncentrace anthokyanů $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$
	A ₅₁₀	A ₇₁₀	A ₅₁₀	A ₇₁₀	
Amur	0,205	0,030	0,084	0,037	62,4 ± 2,3
Průhonický a, b, c	0,216	0,047	0,092	0,053	63,4 ± 13,9
Lebeduška	0,272	0,051	0,106	0,055	80,4 ± 7,1
Maistar	0,234	0,024	0,069	0,027	83,1 ± 17,6
Průhonický letní	0,303	0,072	0,135	0,077	85,4 ± 10,4
Gerda	0,273	0,043	0,092	0,046	92,6 ± 17,3
Goluboje vereteno	0,312	0,061	0,117	0,062	94,6 ± 3,5
Tomička	0,275	0,057	0,111	0,089	95,1 ± 19,8
Sinnaja Ptica	0,264	0,022	0,067	0,025	100,0 ± 7,2
Malion	0,271	0,025	0,061	0,027	100,1 ± 17,2
Leningradský velikán	0,312	0,036	0,100	0,042	103,8 ± 13,6
Viola	0,332	0,047	0,108	0,049	108,7 ± 7,2
D altaj	0,379	0,070	0,149	0,072	115,5 ± 9,4
Kamčadalka	0,357	0,065	0,129	0,069	116,3 ± 11,6
Fialka	0,379	0,056	0,125	0,060	122,0 ± 12,2
Průhonický 9	0,425	0,068	0,138	0,071	128,5 ± 15,8
Kamtschatica	0,386	0,049	0,121	0,053	134,0 ± 10,5
Remont	0,374	0,046	0,097	0,046	136,9 ± 10,4
Morena	0,366	0,040	0,091	0,045	137,9 ± 12,7
Vasjuganská	0,330	0,006	0,045	0,007	141,3 ± 8,8
Bakcarskaja	0,366	0,027	0,075	0,032	148,1 ± 11,1
Valchova	0,450	0,032	0,093	0,036	170,8 ± 11,4

Blue Velved	0,507	0,039	0,106	0,044	189,4 ± 22,0
Lipnická	0,549	0,066	0,146	0,069	202,0 ± 11,9
Zoluška	0,570	0,029	0,094	0,034	227,7 ± 2,6
Helfštýn	0,578	0,046	0,123	0,051	228,3 ± 11,6
Modrý Triumph	0,897	0,018	0,106	0,022	399,4 ± 21,7

Množství anthokyanů v odrůdách zimolezu se pohybovalo v rozmezí od 62,4 do 399,4 mg·100 g⁻¹. Nejnižší množství anthokyanů bylo naměřeno u odrůdy Amur (62,4 mg·100 g⁻¹), naopak nejvyšší množství anthokyanů bylo naměřeno u odrůdy Modrý Triumph (399,4 mg·100 g⁻¹). Tato odrůda také měla nejvyšší obsah polyfenolických látek. Porovnání množství anthokyanů znázorňují opět dva grafy číslo 4 a 5.



Graf 4: Porovnání množství anthokyanů v jednotlivých odrůdách zimolezů

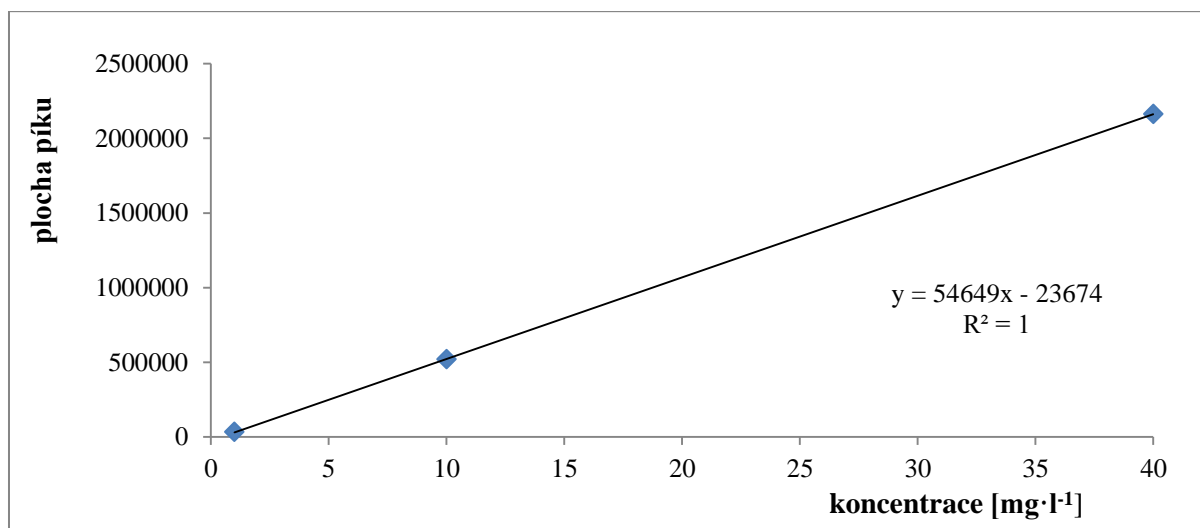


Graf 5: Porovnání množství anthokyanů v jednotlivých odrůdách zimolezů

Obsah anthokyanů se u většiny odrůd pohyboval ve srovnatelném rozmezí od 90 do 200 mg · 100 g⁻¹. Chybové úsečky zobrazené u hodnot značí interval spolehlivosti daného měření a výsledku. Odborná literatura udává množství anthokyanů od 400 – 1500 mg · 100 g⁻¹ plodů. Naměřené množství bylo menší, což může být způsobeno klimatickými podmínkami, stupněm zralosti plodů a dalšími faktory.

4.3 Stanovení vitamínu C

Obsah vitamínu C byl stanoven dle postupu v kapitole 3.5. Z kalibrační řady byla vygenerována rovnice regrese a pomocí vztahu (4) byla koncentrace kyseliny askorbové přepočítána na $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ plodů.



Graf 6: Kalibrační řada pro stanovení vitamínu C pomocí HPLC

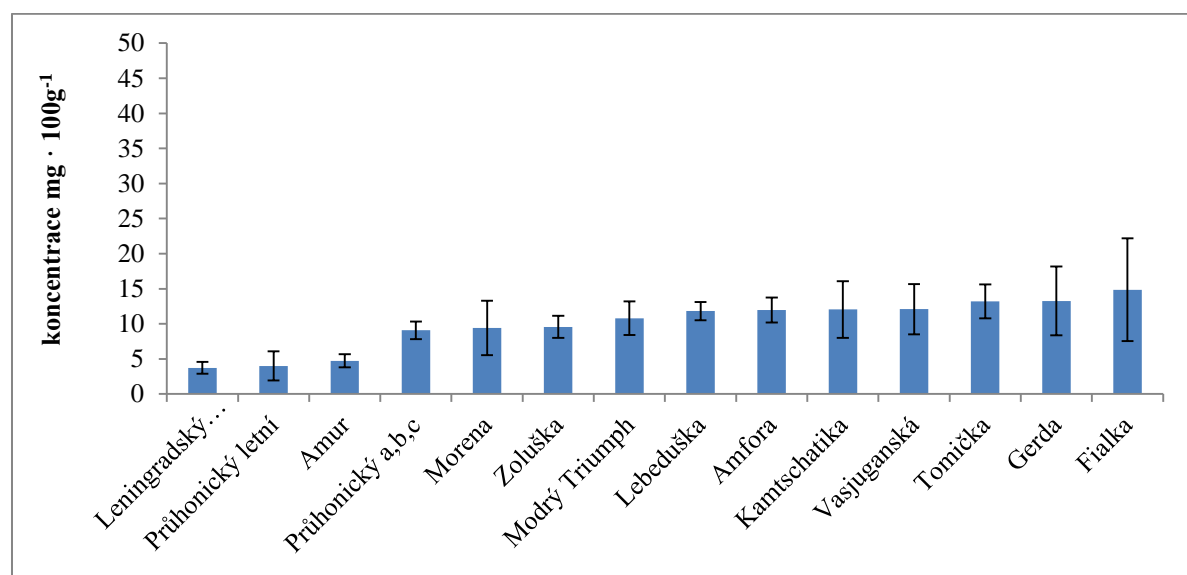
4.3.1 Výpočtené koncentrace vitamínu C

Tabulka 5: Vypočítané průměrné koncentrace vitamínu C v různých odrůdách zimolezů přepočítané na 100 g plodů s intervalem spolehlivosti měření.

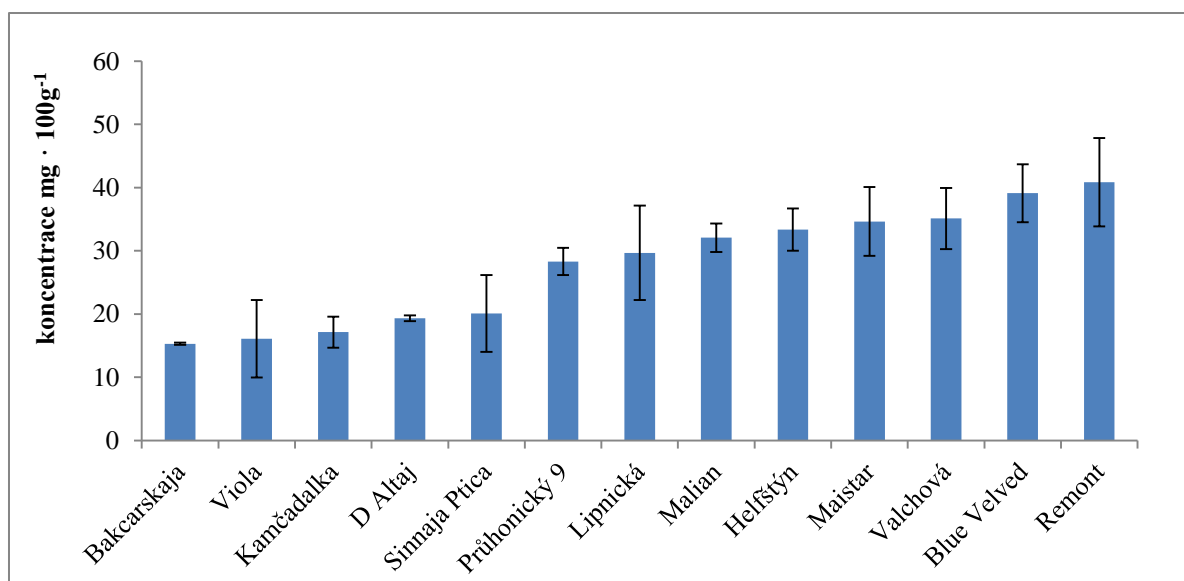
odrůda	průměrná koncentrace vitamínu C ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)
Leningradský velikán	$3,7 \pm 0,8$
Průhonický letní	$4,0 \pm 2,1$
Amur	$4,7 \pm 0,9$
Průhonický a,b,c	$9,1 \pm 1,3$
Morena	$9,4 \pm 3,9$
Zoluška	$9,6 \pm 1,6$
Modrý Triumph	$10,8 \pm 2,4$
Lebeduška	$11,8 \pm 1,3$
Amfora	$12,0 \pm 1,8$
Kamtschatika	$12,1 \pm 4,0$
Vasjuganská	$12,1 \pm 3,6$
Tomička	$13,2 \pm 2,4$
Gerda	$13,3 \pm 4,9$

Fialka	$14,9 \pm 7,3$
Bakcarskaja	$15,3 \pm 0,2$
Viola	$16,1 \pm 6,1$
Kamčadalka	$17,2 \pm 2,5$
D Altaj	$19,4 \pm 0,5$
Sinnaja Ptica	$20,1 \pm 6,1$
Průhonický 9	$28,3 \pm 2,1$
Lipnická	$29,7 \pm 7,5$
Malian	$32,1 \pm 2,2$
Helfštýn	$33,4 \pm 3,3$
Maistar	$34,6 \pm 5,4$
Valchova	$35,1 \pm 4,8$
Blue Velved	$39,1 \pm 4,6$
Remont	$40,9 \pm 7,0$

Nejvyšší koncentrace kyseliny askorbové byla naměřena u odrůdy Remont $40,9 \pm 7,0$ $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Nejnižší obsah kyseliny askorbové byl naměřen u odrůdy Leningradský velikán $3,7 \pm 0,8$ $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Většina odborné literatury udává množství kyseliny askorbové od 20 do 60 $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ v závislosti na klimatických podmínkách.



Graf 7: Srovnání množství vitamínu C mezi jednotlivými odrůdami



Graf 8: Srovnání množství vitamínu C mezi jednotlivými odrůdami

Na grafech 7 a 8 jsou znázorněny rozdíly mezi obsahem kyseliny askorbové mezi jednotlivými odrůdami. Odrůdy Remont a Blue Velved měly více než desetkrát větší obsah vitamínu C nežli odrůda Leningradský velikán, Průhonický letní a odrůda Amur. Pouze devět odrůd mělo obsah kyseliny askorbové v rozmezí, jaké udává odborná literatura, žádná z odrůd nedosáhla vyšších hodnot a zbylých osmnáct odrůd mělo obsah kyseliny askorbové nižší. Chybové úsečky znázorněny u každého sloupce grafu reprezentují interval spolehlivosti měření.

5 Závěr

Zimolez kamčatský by mohl být v České Republice nejrannějším ovocem, neboť v našich klimatických podmínkách dozrávají některé jeho odrůdy již koncem května. Je to drobné ovoce s vysokým obsahem biologicky aktivních látek prospěšných lidskému zdraví. Proto bylo náplní této diplomové práce stanovit vybrané biologicky aktivní látky v dostupných odrůdách zimolezu kamčatského. Celkem byly analyzovány plody 28 odrůd: *Maistar*, *Goluboj vereteno*, *Tomička*, *Remont*, *Průhonická 9*, *Kamtschatica*, *Blue Velved*, *D altaj*, *Lipnická*, *Fialka*, *Helfštýn*, *Amur*, *Průhonický a b c*, *Průhonický letní*, *Valchova*, *Morena*, *Gerda*, *Leningradský velikán*, *Kamčadalka*, *Bakcarská*, *Lebeduška*, *Zoluška*, *Malion*, *Vasjuganská*, *Viola*, *Modrý Triumph*, *Sinnaja Ptica a Amfora*. Odrůda *Amfora* byla z důvodu malého množství vzorku analyzována pouze pro stanovení vitamínu C a odrůda *Goluboj vereteno* pouze pro celkový obsah polyfenolických látek a anthokyanů. Teoretická část práce byla zaměřena botanický popis zimolezu kamčatského, dále informovala o významných nutričních látkách, které zimolez obsahuje. Experimentální část byla věnována analýze celkových polyfenolů, anthokyanů a vitamínu C v dodaných odrůdách.

Celkové fenolické látky byly stanoveny spektrofotometricky reakcí vzorku s Folin - Ciocalteuovým činidlem za vzniku modrého zbarvení, které bylo proměřováno při 750 nm. Nejvyšší obsah fenolických látek měla odrůda *Modrý Triumph* ($723,6 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) a poté odrůda *Valchova* ($546,3 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Naopak nejnižší obsah polyfenolických látek měla odrůda *Amur* ($122 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Obsah fenolů v této odrůdě byl dvakrát nižší nežli odrůda s druhým nejnižším množstvím těchto látek. Naopak odrůda *Modrý Triumph* o dost převyšovala ostatní odrůdy v množství fenolických látek.

Dále bylo stanovováno celkové množství anthokyanů pH diferenciální metodou. Nejvyšší koncentrace anthokyanů byla nalezena opět u odrůdy *Modrý Triumph* $399,4 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ a nejnižší koncentrace byla naměřena u odrůdy *Amur* ($62,4 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Rozdíl mezi odrůdou *Modrý Triumph*, která měla nejvyšší obsah anthokyanů a ostatními odrůdami byl opět značný. Odrůda *Helfštýn*, mající ve srovnání odrůd druhý nejvyšší obsah anthokyanů ($228,3 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ plodu), měla o 44 % menší obsah těchto látek.

Poslední analýzou bylo stanovení vitamínu C vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Z naměřených výsledků vyplývá, že nejvyšší obsah kyseliny askorbové měla odrůda *Remont* ($40,9 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ plodu). Nejmenší obsah kyseliny askorbové měla odrůda *Leningradský velikán* ($3,7 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ plodu). I v případě této analýzy byl rozdíl mezi odrůdou

s nejvyšším a s nejnižším obsahem kyseliny askorbové výrazný (více jak desetinásobný). Odrůda *Modrý Triumph*, která byla nejlepší v předchozích dvou analýzách, měla překvapivě nízký obsah vitamínu C oproti ostatním odrůdám, „pouze“ $10,8 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ plodů.

Celkově se dá říci, že odrůdou s nejvyšším obsahem tří analyzovaných biologicky aktivních látek je odrůda *Valchová*, která měla druhý nejvyšší obsah polyfenolických látek, třetí nejvyšší obsah kyseliny askorbové a šestý nejvyšší obsah anthokyanů. Další perspektivní odrůdou je *Modrý Triumph*, který měl nejvyšší obsah fenolických látek a anthokyanů, ale nižší obsah kyseliny askorbové. Podobné výsledky jako odrůda *Modrý Triumph* má odrůda *Zoluška*, která měla také vysoké obsahy polyfenolů a anthokyanů, ale nižší obsah vitamínu C. Odrůda *Helšťtýn* měla podobné výsledky jako odrůda *Valchová*. Patří k odrůdám s vysokým obsahem všech tří analyzovaných biologicky aktivních látek.

Odrůdou s nejnižšími výsledky co do obsahu analyzovaných látek je odrůda *Amur*, která měla nejnižší obsah anthokyanů i fenolických látek a třetí nejnižší obsah vitamínu C. Mezi další odrůdy mající nízký obsah stanovovaných látek patří odrůdy *Průhonický letní* a *Průhonický a,b,c*.

Naměřené hodnoty se v porovnání s tím, co udává odborná literatura, v některých případech lišily. To může být způsobeno klimatickými podmínkami, typem půdy, stupněm zralosti a dalšími faktory ovlivňující obsah látek v plodech.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HEINRICH, J.; ŠVARCOVÁ, I.; VALENTOVÁ, K. Plody *Lonicera caerulea*: Perspektivní funkční potravina a zdroj biologicky aktivních látek. *Chem. Listy*, 2008, vol. 102, pp. 245–254.
- [2] RICHTER, M., *Malý obrazový atlas odrůd ovoce*. Vyd. 1. Lanškroun: TG tisk, c2004, 120 s. Ovoce. ISBN 80-903-4872-6.
- [3] PAPRŠTEIN, F., *Technologie pěstování zimolezu (Lonicera sp.)*. Holovousy: Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský, 2009, 36 s. ISBN 978-80-87030-08-0.
- [4] CAGÁŇOVÁ, I. Rod *Lonicera* L. jako ovocný druh. *Zahradnictví*, 1994, roč. 21, č. 2, s. 103-108
- [5] MARKOVÁ R., 2001. Study of vegetative, growing and economic character of genus *Lonicera subsect. caerulea* Rehd. Proc. 9th Inter. Conf. of Horticulture, Lednice, 3-6 September: V. 1: 130-135.
- [6] *Popínavé rostliny* [online]. [cit. 2015-02-20]. Okrasné dřeviny. Dostupné z: <http://www.zahrada-zizka.cz/obr/lonicera%20peryclimenumserotina.JPG>.
- [7] *Méně obvyklé druhy ovoce* [online]. [cit. 2015-04-18] Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=1964
- [8] BORS, B., Blue Honeysuckle. In *Blue Honeysuckle* [online]. Saskatoon, Saskatchewan, Canada: Department of Plant Sciences, University of Saskatchewan, 2006 [cit. 2015-02-20]. Dostupné z: http://www.fruit.usask.ca/articles/blue_honeysuckle2.pdf.
- [9] *Rukověť zahrádkáře 2009* [online]. Praha: Český zahrádkářský svaz, 2008 [cit. 2015-02-21]. Dostupné z: <http://www.zahradkari.cz/odborne/rukovet/pdf/ruko2009.zip>.
- [10] MAŁODOBRY, M., BIENIASZ, M., DZIEDZIC, E., Evaluation of the yield and some components in the fruit of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* var. *edulis* Turcz. Freyn.). *Folia Horticulturae*. 2010, vol. 22, issue 1. DOI: 10.2478/fhort-2013-0150.

- [11] RYBNÍČKOVÁ, E. *Zimolez kamčatský - netradiční ovoce v České republice*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 54 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
- [12] JURIKOVA, T., ROP, O., MLCEK, J., SOCHOR, J., BALLA, S., SZEKERES, L., HEGEDUSOVA, A., HUBALEK, J., ADAM, V., KIZEK, R., Phenolic Profile of Edible Honeysuckle Berries (Genus *Lonicera*) and Their Biological Effects. *Molecules*. 2011, vol. 17, issue 12, s. 909-910. DOI: 10.1007/978-1-4020-4585-1_2079.
- [13] JURÁŇOVÁ, J. *Stanovení vybraných nutričních faktorů v některých druzích minoritního ovoce*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 103 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
- [14] JANICK, J., PAULL, E., R., *The encyclopedia of fruit*. Cambridge, MA: CABI North American Office, c2008.
- [15] HEJDUK, J., *Pelargonie* [online]. 2006 [cit. 2015-04-20]. Kamčatská borůvka. Dostupné z: www.pelargonie.cz/boruvka1.html.
- [16] ROP., O.; ŘEZNÍČEK, V.; MLČEK, J.; JURÍKOVÁ, T.; BALÍK, J.; SOCHOR, J.; KRAMÁŘOVÁ, D. Antioxidant and radical oxygen species scavenging activities of 12 cultivars of blue honeysuckle fruit. *Hort. Sci. (Prague)*, 2011, vol. 38, no. 2, pp. 63-70. ISSN 0862-867X.
- [17] JAROŠOVÁ, M. *Separační metody pro stanovení polyfenolických látek ve víně*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, 2012. 111. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Bořivoj Klejdus, Ph.D.
- [18] KLEJDUS, B. *Separace a identifikace isoflavonů v rostlinném materiálu*. Habilitační práce. Univerzita Palackého v Olomouci, 2004. 51 s.
- [19] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*. Tábor: Osis, 2002. 320 s. ISBN 80-866-59-01-1.
- [20] JONES, F. *Víno: Každý den sklenku pro zdraví*. 1. vyd. Praha: Knižní klub, 1998. 235 s. ISBN 80-7176-756-5.

- [21] PELIKÁNOVÁ, B. *Stanovení vybraných chemických parametrů v plodech nových odrůd rybízů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 147. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
- [22] ALAÑÓN, M. E., a kol. A study of the antioxidant capacity of oak wood used in wine ageing and the correlation with polyphenol composition. *LWT : Food Chemistry*. 2011, 128, s. 997-1002.
- [23] KREJČÍKOVÁ, A., Zajímavé reakce fenolických látek. [online]. [cit. 2015-04-24]. Dostupné z: <http://konference.osu.cz/svk/sbornik2012/pdf/budoucnost/didaktika/krejcikova.pdf>
- [24] LUŠTINEC, J., ŽÁRSKÝ, V., *Úvod do fyziologie vyšších rostlin*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2003, 261 s. ISBN 80-246-0563-5.
- [25] HESS, D., *Fyziologie rostlin*. 1. vyd. Praha: Academia, 1983, 341 s.
- [26] A-Z slovník pro spotřebitele: Informační centrum Ministerstva zemědělství. *Třísloviny* [online]. [cit. 2015-04-25]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92418.aspx>
- [27] ONDREJOVIČ, M., MALIAR, T., POLÍVKA, L., ILHÁR, S., Polyfenoly jablek. *Chemické Listy*. 2009, č. 103, s. 394-400.
- [28] MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND CH., RÉMÉSY, CH., JIMÉNEZ, L., Polyphenols: food sources and bioavailability. In: *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2004, s. 727-747 [cit. 2015-03-20]. 79. Dostupné z: <http://ajcn.nutrition.org/content/79/5/727.full#F1>
- [29] MARCANÍKOVÁ, K., BEŇOVÁ, B., Využití coulometrického detektoru pro analýzu fenolických látek. *Chemické listy*, 2010, č. 104, s. 27 – 30. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_13_s27-s30.pdf
- [30] FRÉMONT, L., ORALLO, F., Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*. 2000, vol. 66, issue 8, s. 577-600. DOI: 10.1201/9781420026474.ch24.

- [31] GALGANO, F., CARUSO, M., PERRETTI, G., FAVATI, F., Authentication of Italian red wines on the basis of the polyphenols and biogenic amines. *European Food Research and Technology*. 2011, vol. 232, issue 5, s. 889-897. DOI: 10.1007/s00217-011-1457-1.
- [32] JIANG, L., HE, S., JIANG, K., SUN, C., PAN, Y., Resveratrol and Its Oligomers from Wine Grapes Are Selective 1 O 2 Quenchers: Mechanistic Implication by High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Tandem Mass Spectrometry and Theoretical Calculation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, vol. 58, issue 16, s. 9020-9027. DOI: 10.1021/jf102005z.
- [33] MÍKA, V., *Fenolické látky v rostlinách*. [1. vyd.]. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2001, 116, 56 s., barev. příl. ISBN 80-865-5507-0.
- [34] *Rostlinné fenolové látky a flavonoidy* [online]. [cit. 2015-02-25]. Dostupné z: <http://web.vscht.cz/~koplikr/Rostlinné%20fenoly%20a%20flavonoidy.pdf>
- [35] ANDERSEN, Ø., MARKHAM, M., MARKHAM, K., *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. Boca Raton, FL: CRC, Taylor, 2006, 1237 p. ISBN 08-493-2021-6.
- [36] VELÍŠEK, J., *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 623 s. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [37] CHAOVANALIKIT, A., THOMPSON, M., M., WROLSTAD, R., E., Characterization and Quantification of Anthocyanins and Polyphenolics in Blue Honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, vol. 52, issue 4, s. 848-852. DOI: 10.1021/jf030509o.
- [38] DAVÍDEK, J., *Sloučeniny ovlivňující barvu potravin* [online]. [cit. 2015-01-25]. Dostupné z: <http://web.vscht.cz/~dolezala/CHPS/11%20Látky%20barevné.pdf>
- [39] CASTAÑEDA-OVANDO, A., PACHECO-HERNÁNDEZ, L. PÁEZ-HERNÁNDEZ, E., RODRÍGUEZ, J., GALÁN-VIDAL, C., Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 2009, vol. 113, issue 4, s. 859-871. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.09.001.

- [40] PALÍKOVÁ, I., *Biologická aktivita bobulovitých plodin Lonicera caerulea L. a Vaccinium macrocarpon Ait.*. Olomouc, 2009. 114 s. Dizertační práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta.
- [41] STERLING, M., *Biolink Group* [online]. 2001 [cit. 2015-04-20]. Anthocyanins. Dostupné z WWW: <<http://www.biolink.no/anthocyanins/category143.html>>.
- [42] GIUSTI, M., WROLSTAD, M., WROLSTAD, R-E., Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2001. ISBN 0471142913.
- [43] ŠTULÍK, K., a kol. *Analytické separační metody*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [44] KLOUDA, P., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O., *Moderní analytické metody*. 3. vydání. Ostrava: Pavel Klouda, 2007, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [45] WELCH, C., WU, Q., SIMON, J., TAKAHASHI, M., UHLIG, S., MANSFIELD, E., Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization. *Current Analytical Chemistry*. 2008, vol. 4, issue 2, s. 167-178. DOI: 10.1016/b978-1-78242-228-0.00006-5.
- [46] VALLS, J., MILLÁN, S., MARTÍ, M-P., BORRÀS, E., AROLA, L., Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of Chromatography A*. 2009, vol. 1216, issue 43, s. 7143-7172. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.07.030.
- [47] KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O., *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 80-708-0586-2.
- [48] COSTA, C-T., HORTON, D., MARGOLIS, S-A., Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2000, vol. 881, 1-2, s. 403-410. DOI: 10.1016/s0021-9673(00)00328-9.
- [49] PÁNEK, J., *Základy výživy a výživová politika*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002, 219 s. ISBN 80-708-0468-8.

- [50] *Sigma-Aldrich* [online]. 2015 [cit. 2015-04-01]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a5960?lang=en®ion=CZ&gclid=CJ-bkvf25MQCFYuWtAod4lwAZg>
- [51] VOSPĚLOVÁ, R., *Obsah kyseliny askorbové v plodech vybraných odrůd rajčat*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Pedagogická Fakulta, 2007. 71 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Štěpánka Chmelová, Ph.D.
- [52] STRUNECKÁ, A., PATOČKA, J., *Doba jedová*. Vyd. 1. Praha: Triton, 2011, 295 s. ISBN 978-80-7387-469-8.
- [53] NOVÁKOVÁ, L., SOLICH, P., SOLICHOVÁ, D., BOGNÁR, A., DAOOD, H-G., HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2008, vol. 27, issue 10, s. 282-284. DOI: 10.1533/9781845698140.6.282.
- [54] PISOSCHI, A-M., POP, A., SERBAN, A-I., FAFANEATA, C., Electrochemical methods for ascorbic acid determination. *Electrochimica Acta*. 2014, vol. 121, s. 443-460. DOI: 10.1016/j.electacta.2013.12.127.
- [55] ARYA, S-P., MAHAJAN, M., JAIN, P., Non-spectrophotometric methods for the determination of Vitamin C. *Analytica Chimica Acta*. 2000, vol. 417, issue 1, s. 1-14. DOI: 10.1016/S0003-2670(00)00909-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267000009090>

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CZE - capillary zone electrophoresis

CUPRAC - copper reduction assay

HPLC - high performance (pressure) liquid chromatography

TLC - thin layer chromatography

UV – ultraviolet radiation

VIS - visible radiation

PC – paper chromatography

ESI – electrospray ionization

TOF – time of flight

NMR – nuclear magnetic resonance

PBM - Price – Butler Method

SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1:** Statistické zpracování výsledků koncentrací celkových fenolických látek [$\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$] v odrůdách zimolezu ($n = 3$, $\alpha = 0,01$)
- Příloha 2:** Statistické zpracování výsledků koncentrací celkových anthokyanů [$\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$] v odrůdách zimolezu ($n = 3$, $\alpha = 0,01$)
- Příloha 3:** Statistické zpracování výsledků koncentrací kyseliny askorbové [$\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$] v odrůdách zimolezu ($n = 3$, $\alpha = 0,01$)
- Příloha 4:** Výstup z vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Příloha 1: Statistické zpracování výsledků koncentrací celkových fenolických látek
[mg·100 g⁻¹] v odrůdách zimolezu (n = 3, α = 0,01)

odrůda	A	c [mg/100 g]	s	s _r [%]	s ²	IS
Amur	0,098	122,039	5,982	4,770	35,780	19,789
Průhonický letní	0,196	250,258	3,874	1,523	15,005	21,619
Průhonický a, b, c	0,198	250,640	2,236	0,869	5,002	18,468
Kamtschatica	0,225	290,862	4,844	1,654	23,469	24,624
Malion	0,237	290,996	3,282	1,066	10,773	14,217
Průhonický 9	0,260	299,563	2,481	0,732	6,156	27,759
Tomička	0,239	300,593	3,223	1,037	10,388	24,879
Maistar	0,256	329,228	3,454	1,033	11,927	12,312
Fialka	0,276	338,962	3,874	1,077	15,005	12,815
Kamčadalka	0,260	339,752	3,773	1,113	14,235	22,196
D Altaj	0,268	346,439	2,149	0,616	4,617	21,619
Goluboje vereteno	0,284	358,691	3,773	1,017	14,235	34,276
Vasjuganská	0,280	360,655	2,704	0,740	7,310	12,815
Blue Velved	0,297	361,368	4,342	1,120	18,852	22,196
Gerda	0,299	391,348	3,773	0,967	14,235	15,079
Lebeduška	0,326	402,863	5,513	1,297	30,394	14,217
Sinnaja Ptica	0,311	406,072	3,454	0,850	11,927	21,619
Lipnická	0,318	412,215	2,236	0,538	5,002	7,108
Bakcarskaja	0,319	416,431	2,236	0,537	5,002	21,619
Remont	0,326	419,042	4,297	1,010	18,467	12,815
Helfštýn	0,328	424,943	3,773	0,880	14,235	31,591
Morena	0,343	440,323	2,481	0,555	6,156	27,759
Viola	0,358	448,054	2,842	0,608	8,079	18,807
Leningradský velikán	0,365	453,547	1,241	0,260	1,539	15,492
Zoluška	0,385	474,632	4,844	0,964	23,469	16,287
Valchova	0,442	546,328	2,481	0,430	6,156	21,619
Modrý Triumph	0,551	723,594	3,773	0,523	14,235	19,789

A – průměrná absorbance, c – koncentrace celkových fenolických látek, s – směrodatná odchylka, s_r – relativní směrodatná odchylka, s² - rozptyl, IS – interval spolehlivosti

Příloha 2 Statistické zpracování výsledků koncentrací celkových anthokyanů
[$\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$] v odrůdách zimolezu ($n = 3$, $\alpha = 0,01$)

odrůda	A	c [$\text{mg}/100 \text{ g}$]	s	s_r [%]	s^2	IS
Amur	0,128	62,408	0,398	0,638	0,158	2,281
Průhonický a, b, c	0,130	63,412	2,423	3,820	5,869	13,882
Lebeduška	0,169	80,420	1,247	1,550	1,554	7,143
Maistar	0,168	83,083	3,078	3,705	9,474	17,637
Průhonický letní	0,173	85,440	1,815	2,124	3,294	10,399
Gerda	0,184	92,591	3,023	3,265	9,139	17,323
Golubojе veretenо	0,195	94,607	0,604	0,639	0,365	3,461
Tomička	0,196	95,089	3,455	3,633	11,937	19,798
Sinnaja Ptica	0,200	100,020	1,250	1,249	1,561	7,160
Malion	0,211	100,075	3,003	3,001	9,019	17,209
Leningradský velikán	0,218	103,809	2,365	2,278	5,593	13,552
Viola	0,226	108,669	1,260	1,160	1,588	7,221
D Altaj	0,232	115,511	1,641	1,420	2,692	9,401
Kamčadalka	0,232	116,318	2,022	1,739	4,090	11,588
Fialka	0,258	121,987	2,123	1,741	4,509	12,168
Průhonický 9	0,290	128,530	2,761	2,148	7,622	15,819
Kamtschatica	0,269	133,970	1,831	1,367	3,354	10,494
Remont	0,277	136,860	1,817	1,328	3,301	10,411
Morena	0,280	137,911	2,218	1,608	4,918	12,707
Vasjuganská	0,286	141,287	1,529	1,082	2,337	8,761
Bakcarskaja	0,296	148,051	1,932	1,305	3,733	11,071
Valchova	0,361	170,774	1,984	1,162	3,936	11,368
Blue Velved	0,406	189,435	3,838	2,026	14,731	21,993
Lipnická	0,406	202,044	2,083	1,031	4,341	11,938
Zoluška	0,481	227,719	0,446	0,196	0,199	2,556
Helfštýn	0,460	228,317	2,026	0,887	4,106	11,611
Modrý Triumph	0,795	399,378	3,787	0,948	14,345	21,703

A – průměrná absorpance, c – koncentrace celkových fenolických látek, s – směrodatná odchylka, s_r – relativní směrodatná odchylka, s^2 - rozptyl, IS – interval spolehlivosti

Příloha 3: Statistické zpracování výsledků koncentrací kyseliny askorbové [mg·100 g⁻¹] v odrůdách zimolezu (n = 3, α = 0,01)

odrůda	c [mg/100 g]	s	s _r [%]	s ²	IS
Leningradský velikán	3,726	0,145	3,899	0,021	0,833
Průhonický letní	3,999	0,362	9,046	0,131	2,073
Amur	4,730	0,162	3,423	0,026	0,928
Průhonický a,b,c	9,078	0,219	2,416	0,048	1,257
Morena	9,425	0,678	7,194	0,460	3,885
Zoluška	9,567	0,277	2,891	0,076	1,585
Modrý Triumph	10,806	0,415	3,838	0,172	2,376
Lebeduška	11,821	0,225	1,907	0,051	1,292
Amfora	11,981	0,311	2,592	0,096	1,780
Kamtschatka	12,052	0,706	5,855	0,498	4,043
Vasjuganská	12,094	0,626	5,173	0,391	3,585
Tomička	13,208	0,420	3,179	0,176	2,406
Gerda	13,254	0,856	6,456	0,732	4,904
Fialka	14,867	1,279	8,602	1,635	7,328
Bakcarskaja	15,292	0,031	0,206	0,001	0,180
Viola	16,105	1,072	6,657	1,149	6,143
Kamčadalka	17,150	0,428	2,498	0,184	2,455
D Altaj	19,357	0,080	0,414	0,006	0,459
Sinnaja Ptica	20,095	1,060	5,273	1,123	6,071
Průhonický 9	28,315	0,375	1,324	0,141	2,148
Lipnická	29,674	1,303	4,391	1,697	7,466
Malian	32,081	0,391	1,217	0,153	2,238
Helfštýn	33,371	0,582	1,745	0,339	3,338
Maistar	34,645	0,949	2,739	0,901	5,438
Valchová	35,114	0,840	2,393	0,706	4,814
Blue Velved	39,112	0,802	2,049	0,643	4,593
Remont	40,852	1,222	2,991	1,493	7,001

c – průměrná koncentrace celkového obsahu vitamínu C, s – směrodatná odchylka, s_r – relativní směrodatná odchylka, s² - rozptyl, IS – interval spolehlivosti

Příloha 4 Výstup z vysokoúčinné kapalinové chromatografie

